

**Zum Pyruvatgehalt der Milch: Modellversuche über den
Einfluß unterschiedlicher Keimbelastungen und
Temperaturen bei der Lagerung
sowie Auswirkung der Probenbehandlung
in einer Zellaufbrechbombe**

Herbert Stauß

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551903_0055

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zum Pyruvatgehalt der Milch: Modellversuche über den
Einfluß unterschiedlicher Keimbelastungen und Temperaturen
bei der Lagerung sowie Auswirkung der Probenbehandlung in
einer Zellaufbrechbombe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Herbert Stauß

aus

Schramberg im Schwarzwald

München 1979



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. B. Gedek
Tag der Promotion:	27. Juli 1979

1.	Einleitung	1
2.	Thesen	2
3.1.	Wissenschaftstheoretische Grundlagen	3
3.2.	Methodenwahl und -begründung	4
3.3.	Erhebungsinstrumente	5
3.4.	Erhebungsinstrumente	6
3.5.	Erhebungsinstrumente	7
3.6.	Erhebungsinstrumente	8
3.7.	Erhebungsinstrumente	9
3.8.	Erhebungsinstrumente	10
3.9.	Erhebungsinstrumente	11
3.10.	Erhebungsinstrumente	12
3.11.	Erhebungsinstrumente	13
3.12.	Erhebungsinstrumente	14
3.13.	Erhebungsinstrumente	15
3.14.	Erhebungsinstrumente	16
3.15.	Erhebungsinstrumente	17
3.16.	Erhebungsinstrumente	18
3.17.	Erhebungsinstrumente	19
3.18.	Erhebungsinstrumente	20
3.19.	Erhebungsinstrumente	21
3.20.	Erhebungsinstrumente	22
3.21.	Erhebungsinstrumente	23
3.22.	Erhebungsinstrumente	24
3.23.	Erhebungsinstrumente	25
3.24.	Erhebungsinstrumente	26
3.25.	Erhebungsinstrumente	27
3.26.	Erhebungsinstrumente	28
3.27.	Erhebungsinstrumente	29
3.28.	Erhebungsinstrumente	30
3.29.	Erhebungsinstrumente	31
3.30.	Erhebungsinstrumente	32
3.31.	Erhebungsinstrumente	33
3.32.	Erhebungsinstrumente	34
3.33.	Erhebungsinstrumente	35
3.34.	Erhebungsinstrumente	36
3.35.	Erhebungsinstrumente	37
3.36.	Erhebungsinstrumente	38
3.37.	Erhebungsinstrumente	39
3.38.	Erhebungsinstrumente	40
3.39.	Erhebungsinstrumente	41
3.40.	Erhebungsinstrumente	42
3.41.	Erhebungsinstrumente	43
3.42.	Erhebungsinstrumente	44
3.43.	Erhebungsinstrumente	45
3.44.	Erhebungsinstrumente	46
3.45.	Erhebungsinstrumente	47
3.46.	Erhebungsinstrumente	48
3.47.	Erhebungsinstrumente	49
3.48.	Erhebungsinstrumente	50
3.49.	Erhebungsinstrumente	51
3.50.	Erhebungsinstrumente	52
3.51.	Erhebungsinstrumente	53
3.52.	Erhebungsinstrumente	54
3.53.	Erhebungsinstrumente	55
3.54.	Erhebungsinstrumente	56
3.55.	Erhebungsinstrumente	57
3.56.	Erhebungsinstrumente	58
3.57.	Erhebungsinstrumente	59
3.58.	Erhebungsinstrumente	60
3.59.	Erhebungsinstrumente	61
3.60.	Erhebungsinstrumente	62
3.61.	Erhebungsinstrumente	63
3.62.	Erhebungsinstrumente	64
3.63.	Erhebungsinstrumente	65
3.64.	Erhebungsinstrumente	66
3.65.	Erhebungsinstrumente	67
3.66.	Erhebungsinstrumente	68
3.67.	Erhebungsinstrumente	69
3.68.	Erhebungsinstrumente	70
3.69.	Erhebungsinstrumente	71
3.70.	Erhebungsinstrumente	72
3.71.	Erhebungsinstrumente	73
3.72.	Erhebungsinstrumente	74
3.73.	Erhebungsinstrumente	75
3.74.	Erhebungsinstrumente	76
3.75.	Erhebungsinstrumente	77
3.76.	Erhebungsinstrumente	78
3.77.	Erhebungsinstrumente	79
3.78.	Erhebungsinstrumente	80
3.79.	Erhebungsinstrumente	81
3.80.	Erhebungsinstrumente	82
3.81.	Erhebungsinstrumente	83
3.82.	Erhebungsinstrumente	84
3.83.	Erhebungsinstrumente	85
3.84.	Erhebungsinstrumente	86
3.85.	Erhebungsinstrumente	87
3.86.	Erhebungsinstrumente	88
3.87.	Erhebungsinstrumente	89
3.88.	Erhebungsinstrumente	90
3.89.	Erhebungsinstrumente	91
3.90.	Erhebungsinstrumente	92
3.91.	Erhebungsinstrumente	93
3.92.	Erhebungsinstrumente	94
3.93.	Erhebungsinstrumente	95
3.94.	Erhebungsinstrumente	96
3.95.	Erhebungsinstrumente	97
3.96.	Erhebungsinstrumente	98
3.97.	Erhebungsinstrumente	99
3.98.	Erhebungsinstrumente	100
3.99.	Erhebungsinstrumente	101
3.100.	Erhebungsinstrumente	102

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Literatur</u>	2
2.1. Gütebewertung von Rohmilch	2
2.2. Bedeutung der Produktionshygiene für die bakterio- logische Wertigkeit der Rohmilch	3
2.2.1. Einfluß der Melkhygiene	4
2.2.2. Einfluß der Milchlagerung	4
2.3. Methoden zur Erfassung der mikrobiologischen Wer- tigkeit von Rohmilch	8
2.3.1. Reduktionsproben	9
2.3.2. Pyruvatbestimmung	10
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	15
3.1. Modellversuche zur Pyruvatbildung durch Mikroor- ganismen bei unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen und Temperaturen	15
3.1.1. Mikroorganismen und Nährböden	15
3.1.2. Versuchsanordnung	16
3.1.3. Keimzahl- und Pyruvatbestimmung	17
3.1.4. Ergebnisse	18
3.1.4.1. Pseudomonadenreinkulturen	18
3.1.4.2. Streptokokkenreinkulturen	29
3.1.4.3. Mischkulturen aus Pseudomonaden- und Streptokok- kenstämmen	37
3.2. Untersuchung des Pyruvatgehaltes in Kulturen nach mechanischer Zerstörung der Bakterienzellen mit- tels Zellaufbrechbombe	41
3.2.1. Mikroorganismen und Nährböden	41
3.2.2. Prinzip und Anordnung der Versuche	41
3.2.3. Ergebnisse	43

	Seite
3.2.3.1. Pseudomonaden- und Streptokokkenkulturen in Nährbouillon	43
3.2.3.2. Pseudomonaden- und Streptokokkenkulturen in hitzebehandelter Vollmilch	44
3.2.3.3. Rohmilch mit originärer Flora	48
4. <u>Diskussion</u>	50
5. Zusammenfassung / Summary	57
6. Literaturverzeichnis	59

1. Einleitung

Die objektive Ermittlung des mikrobiologischen Status von Rohmilch im Rahmen der Gütebewertung von Anlieferungsmilch stößt mit zunehmender Verbreitung der Kühlung in den Erzeugerbetrieben in den letzten Jahren immer mehr auf Schwierigkeiten, zumal die Reduktionsproben bei gekühlter Rohmilch im negativen Fall keine sichere Aussage zulassen. Konzentrationsprozesse in der Milchwirtschaft und dadurch erforderliche neue Transportsysteme im Rohmilchanlieferungsbereich haben eine Verlängerung der Lagerungsdauer von Rohmilch im Erzeugerbetrieb z. T. über zwei Tage zur Folge. Damit aber steigen die Anforderungen an die mikrobiologische Wertigkeit der Rohmilch und somit auch an die Kühlung. Temperaturen von 5°C und darunter sind erforderlich, um die Rohmilchqualität über die verlängerte Lagerungszeit zu sichern.

Als eine Möglichkeit, den bakteriellen Status der Anlieferungsmilch auch unter diesen veränderten Bedingungen zu ermitteln, wird die Messung des Pyruvatgehaltes der Rohmilch diskutiert. Diese Methode bietet zwar hinsichtlich der technischen Durchführung viele Vorteile - z. B. einfache Probenahme, hohe Probenfrequenz im Analysenautomaten - dennoch findet sie nicht uneingeschränkte Zustimmung. So wird insbesondere schlechte Übereinstimmung mit dem Keimgehalt bemängelt. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, Zusammenhänge zwischen Pyruvatgehalt und bakterieller Aktivität in Milch zu studieren. Dazu sollen Pseudomonaden- und Streptokokkenreinkulturen als milchhygienisch besonders relevante Keime mit unterschiedlichen Anfangskeimzahlen sowie Mischkulturen dieser Stämme auf das Pyruvatbildungsvermögen im Nährboden Milch untersucht werden. Zusätzlich soll geprüft werden, ob durch mechanische Zerstörung der Bakterienzellen in einer Zellaufbrechbombe Pyruvat freigesetzt werden kann, um damit evtl. konstantere Verhältnisse für die Messung zu schaffen.

2. Literatur

2.1. Gütebewertung von Rohmilch

Die Abwesenheit pathogener Mikroorganismen, mikrobieller Toxine sowie pharmakologisch wirksamer Substanzen ist nach TERPLAN (1972) die wichtigste Anforderung an die Rohmilchqualität. Aber auch ein möglichst geringer Gehalt an saprophytären Keimen und somatischen Zellen ist sehr wesentlich, zumal nur unter diesen Voraussetzungen die Milch in ihrer Zusammensetzung optimal und für die Herstellung qualitativ hochwertiger Produkte geeignet ist (KLUPSCH, 1967; BECK, 1967; WÖBBECKE und LIMMER, 1973). Die Erhaltung und Förderung der Milchqualität wird in den Verordnungen der Bundesländer über die Prüfung und Bezahlung der Rohmilch, allgemein als Güteverordnungen bezeichnet, geregelt. Diese Güte-VOen schreiben z.B. im Freistaat Bayern vor, daß aufgrund der Ergebnisse der Prüfungen auf Fettgehalt, Eiweißgehalt, Hemmstoffe, bakteriologische Beschaffenheit, Käseereitauglichkeit und Reinheit die Rohmilch eines jeden Erzeugerbetriebes in eine von drei möglichen Güteklassen einzugruppieren ist. Dabei wird der monatliche Durchschnittsfett- bzw. Eiweißgehalt auf Hundertstelprozente berechnet und der Bezahlung ebenso zugrunde gelegt wie die ermittelte Güteklasse. Die Prüfungsparameter variieren in den einzelnen Bundesländern, jedoch werden wesentliche Parameter wie Fettgehalt, bakteriologische Beschaffenheit und Hemmstofftests in den meisten Bundesländern zur Gütebeurteilung der Milch verwendet. Die Prüfung auf Reinheit ist, obwohl sie immer noch durchgeführt werden muß, in ihrem Aussagewert sehr umstritten. Dagegen kommt dem Hemmstoffnachweis und vor allem der Feststellung der mikrobiologischen Wertigkeit größte Bedeutung zu. Nach AROLD (1977) wird die mikrobiologische Wertigkeit der Rohmilch für 97 % der Milcherzeugung noch mit Reduktionsproben festgestellt, obwohl inzwischen allgemein bekannt ist, daß der Aussagewert dieser Untersuchungsergebnisse bei unter Kühlbedingungen gelagerter Rohmilch unzureichend ist. Zum Beispiel er-

geben sich bei der Methylenblauprobe, die monatlich dreimal durchzuführen ist, je nach Entfärbungszeit drei Reduktionsstufen. Stufe 1: d.h. 4 1/2 Stunden und länger; Stufe 2: d.h. 2 bis 4 1/2 Stunden; Stufe 3: d.h. kürzer als 2 Stunden (z.B. Güte-VO des Freistaates Bayern, 1977). Bei 3 % der Milcherzeugung wird dagegen schon die Keimzahlbestimmung zur Bewertung der mikrobiologischen Wertigkeit herangezogen. Im Bundesland Hamburg z.B. werden zur Zeit folgende Keimzahlgrenzen für Rohmilch auf Erzeugerebene zugrunde gelegt (Güte-VO Hamburg, 1975): Güteklasse I: bis 250 000 Keime/ml, Güteklasse II: 250 000 bis 500 000 Keime/ml; Güteklasse III: über 500 000 Keime/ml. Die Milch muß eine Güteklasse schlechter beurteilt werden, wenn der Hemmstofftest positiv war. Die Keimzählung erfolgt mittels elektronischer Mikrokoloniezählung nach TOLLE et al. (1968) oder einer anderen von der zuständigen Behörde im Einzelfall zuzulassenden gleichwertigen Methode.

Nachdem von TOLLE et al. (1972) erstmals das Pyruvat als Parameter bakterieller Stoffwechselaktivität zur Bewertung der Rohmilch vorgeschlagen wurde, haben SUHREN, HEESCHEN und TOLLE (1978) auch für diesen Parameter Grenzwerte erarbeitet, ohne daß dieses Kriterium bisher jedoch Eingang in die Güte-VOen gefunden hat. Danach wäre auf Erzeugerebene eine Differenzierung in folgende drei Stufen vorzunehmen: Werte unter 1,0 ppm Pyruvat entsprechen Stufe I, Werte zwischen 1,1 und 2,0 ppm der Stufe II und solche zwischen 2,1 und 3,0 ppm der Stufe III. Rohmilch mit einem Pyruvatgehalt über 3,0 ppm sollte als "deutlich qualitätsgemindert" angesehen und nicht mehr akzeptiert werden. Zugrunde gelegt wird dabei jeweils der Mittelwert von zwei Untersuchungen während eines Monats.

2.2. Bedeutung der Produktionshygiene für die bakteriologische Wertigkeit der Rohmilch

Die Hygiene der Milcherzeugung beinhaltet alle Maßnahmen, die zur Gewinnung einer gesundheitlich unbedenklichen, in ihrer Zusammen-

setzung optimalen Rohmilch beitragen und die dazu dienen, das Produkt Rohmilch in bester Qualität zu erhalten (TERPLAN, 1971). Dabei spielt die Verhinderung von negativen Beeinträchtigungen durch Eutergesundheitsstörungen, Stallmilieu, Einstreu, Futter, Melkarbeit, Melkgeräte und Lagerung der Milch bis zur Anlieferung an die Molkerei eine entscheidende Rolle (SEELEMANN, 1961; OLSON, 1962; WHITTLESTONE et al., 1962; WALSER, 1966; TERPLAN, 1969; TERPLAN, 1972). Insgesamt unterstützt die Hygiene bei der Milchproduktion die Bemühungen der Kuhhalter, qualitativ hochwertige Milch unter wirtschaftlich günstigen Bedingungen herzustellen, und gleichzeitig vermindert sie das Risiko gesundheitlicher Schäden beim Konsum von Milch und Milchprodukten für den Verbraucher. Außerdem muß schon bei der Milchproduktion vom Rohstoff her die Voraussetzung für die Herstellung qualitativ hochwertiger Milchprodukte geschaffen werden (TERPLAN und GROVE, 1977).

2.2.1. Einfluß der Melkhygiene

Während das Stallmilieu sich auf die Zusammensetzung der Milchflora nur geringgradig auswirkt, ist im Winter bei Stallfütterung die Gefahr von Sporenübertragungen aus dem Rauhfutter möglich (TERPLAN, 1969). Mikrobiologische Analysen ergaben, daß während der Stallhaltung in der Milch aerobe Sporenbildner in einer Anzahl von 100 - 200/ml vorhanden sind, während im Sommer bei Weidegang nur 10 - 20/ml zu finden waren (PETTE, 1961). Ferner kann die Keimzahl der Rohmilch von der Hygiene der Melkarbeit und sehr stark vor allem von der Beschaffenheit der Melkgerätschaften beeinflusst werden (MROZEK, 1972). Geht man nach BIRKNER (1964) davon aus, daß gesunde Milchdrüsen weitgehend keimfreie Milch liefern und vom Strichkanal maximal 1000 Keime pro ml in die Milch übergehen (OLSON, 1962), wird die Bedeutung der Melkhygiene für die Keimkontamination nach dem Verlassen des Euters deutlich (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluß der verschiedenen Kontaminationsquellen auf den Keimgehalt der Rohmilch (nach KÄSTLI, 1963)

Art der Kontamination	Keimzahl /ml Milch
Luftkeime beim Handmelken	100 - 1 500
Melkverunreinigungen	500 - 15 000
Milchgeräte	bis 500 000

Die Kontamination der Milch mit mehreren Hunderttausend Keimen/ml durch die Geräte übertrifft bei weitem die Keimmenge, die durch unsaubere Melkarbeit in die Milch gelangt. Auch TERPLAN (1966) wies schon auf die Bedeutung dieser Beobachtung hin: Er stellte in Milch wenige Sekunden nach Passage der Melkanlage sogar mehrere Millionen Keime/ml fest. Als Ursachen für solche massiven Keimkontaminationen der Milch während des Melkens wurden schon seit längerem ungenügend gereinigte und nicht desinfizierte Gerätschaftsoberflächen erkannt (KIELWEIN, 1961; KANDLER, 1964; TERPLAN, 1966). In der Melkanlage enthalten vom letzten Melken verbliebene Milchreste vor dem folgenden Milchentzug z.B. 10^9 bis 10^{11} Keime/ml (ABO-ELNAGA und KANDLER, 1965). Nur über sorgfältige Reinigung und Desinfektion der Melkgerätschaften (MROZEK, 1975) kann daher ein nachteiliger Einfluß seitens der Gerätschaften auf die Rohmilch verhindert werden. Nach jedem Melken sorgfältig gereinigte und desinfizierte Geräte, die bis zur nächsten Melkzeit möglichst trocken aufzubewahren sind, erlauben die Gewinnung einer Rohmilch mit weniger als 10^5 Keimen/ml (KIELWEIN, 1974).

2.2.2. Einfluß der Milchlagerung

Die wichtigste Maßnahme nach dem Melken ist neben der Reinigung und Desinfektion die sachgerechte Kühlung der Milch. Sie dient dazu, durch Begrenzung des bakteriellen Wachstums in der Milch eine Stabilisierung des bakteriologischen Status zu erreichen (BUSSE, 1965; BECK, 1972). Selbst Tiefkühlung auf Temperaturen unter 5°C kann jedoch die Milchqualität nicht verbessern; denn die Milch bleibt schlecht, wenn sie unhygienisch gewonnen wurde (KRÜGER, 1966). Diese Feststellung geht auch aus Untersuchungen von KUNDRAT (1966) hervor, der Milch mit verschiedenen Anfangskeimzahlen bei drei unterschiedlichen Kühltemperaturen über 24 Stunden gelagert hat (Tabelle 2). Es wird deutlich, daß auch bei Tiefkühlung kein wesentlicher Rückgang der Gesamtkeimzahlen zu erwarten ist, wenn auch einzelne Keimarten durch die Kühlung bei Temperaturen unter 5°C vermindert werden. Nach Angaben von BECKER (1964) ist die Zunahme der Gesamtkeimzahl innerhalb von 24 Stunden bei einer Kühlung auf 4°C auffallend gering. ABO-ELNAGA (1966) stellte ebenfalls bei Kühlung der Milch auf eine Temperatur von 4°C eine Abnahme der in der Ausgangsmilchflora vorhandenen Streptokokken, Mikrokokken und Mikrobakterien zugunsten von Pseudomonaden fest, die bei niedrigen Temperaturen gut wuchsen. Auch HEESCHEN et al. (1969) registrierten bei gekühlter Milch eine Abnahme der Säurebildner unter gleichzeitiger Zunahme von Bakterien mit proteo- und lipolytischem Stoffwechsel.

Ein bemerkenswerter Aspekt der Kühlung von Milch auf Temperaturen unter 7°C ist die dabei eintretende Veränderung der Florazusammensetzung von psychophilen zu psychrotrophen Keimen (KANDLER, 1966; BECK, 1972). Die in gekühlter Milch vermehrungsfähigen psychrotrophen Mikroorganismen zeichnen sich durch proteo- und lipolytische Eigenschaften aus. Ein Anteil von 67% der Gesamtflora besteht aus diesen Psychrotrophen, wenn die Rohmilch 3 Tage bei 4°C gelagert

Tabelle 2: Einfluß der Milchkühlung auf die Gesamtkeimzahl
(nach KUNDRAT, 1966)

Gesamtkeimzahl der Milch ($\times 10^3$ /ml)		Milchtem- peratur °C
frischer- molken	nach 24 Std. Lagerung	
150	300	5
	1 500	10
	30 000	16
50	100	5
	200	10
	5 000	16
5	5	5
	15	10
	1 500	16

wird (GRÜN und KONSTANTINIDOU, 1971). Dadurch sind auch in tiefgekühlter Rohmilch stärkere geruchliche und geschmackliche Abweichungen möglich (HEESCHEN et al., 1969).

Die zahlenmäßig wichtigste taxonomische Gruppe der Psychrotrophen ist nach übereinstimmenden Angaben von BUSSE (1966), GYLLENBERG und EKLUND (1966), THOMAS (1966), GRÜN und KONSTANTINIDOU (1971), LOTT (1972), KIELWEIN (1972) und BRAATZ (1975) die Familie der Pseudomonaden. Ihr Anteil in der Flora gekühlter Milch beträgt nach NAKANISHI und TANABE (1970) 80 bis 95 %. Das Überhandnehmen der Pseudomonaden kann unter anderem auch auf Fehler in der Reinigung und vor allem auch in der Desinfektion der Milchvorratsbehälter zurückzuführen sein, zumal gerade bei diesen gramnegativen Keimen oftmals nur ungenügende Abtö-

tungseffekte mit einigen Desinfektionsmitteln, z.B. mit aktiviertem Sauerstoff oder oberflächenaktiven Wirkstoffen (quartären Ammoniumverbindungen), erreicht werden (MROZEK, 1975). Die Pseudomonaden zählen nach TOLLE (1974) zu den wichtigsten Pyruvatbildnern in Milch und könnten damit in Zukunft - sofern die Gütebewertung der Rohmilch nach dem Pyruvatgehalt erfolgen sollte - eine bedeutende Rolle spielen.

2.3. Methoden zur Erfassung der mikrobiologischen Wertigkeit von Rohmilch

Zur Ermittlung der mikrobiologischen Wertigkeit von Rohmilch werden im allgemeinen Methoden angewendet, die auf der Erfassung der Gesamtkeimzahl oder der Stoffwechselaktivität der Keime beruhen (ZAADHOF und TERPLAN, 1971). Bezüglich der Keimzählung haben folgende Methoden praktische Bedeutung: Mikroskopische Keimzählung nach BREED (1911), Koch'sches Plattengußverfahren entsprechend den Richtlinien des internationalen Milchwirtschaftsverbandes (IDF, 1968), Ösenplattenverfahren nach THOMPSON, DONNELLY und BLACK (1960), Mikrogußmethode nach SHARPE (1973) und die Spiralplattenmethode nach DONNELLY, GYLCHRIST, PEELER und CAMPBELL (1976). Die Durchführung dieser Verfahren basiert weitgehend auf manueller Tätigkeit. Die Auszählung der koloniebildenden Einheiten kann bei den genannten kulturellen Verfahren sowohl visuell als auch automatisch unter Anwendung der Computerbildanalyse (TOLLE et al., 1966; WERNERY, 1972) bzw. eines Laser-Zählgerätes (JARVIS, LACH und WOOD, 1977) durchgeführt werden.

Eine Teilautomatisierung der Keimzählung in Milch wird mit Hilfe der elektronischen Mikrokoloniezählung im Coulter Counter nach TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (1968) erreicht. Einen Überblick über die genannten Verfahren gibt HARTL (1979).

An dieser Stelle soll eingehender auf die Reduktionsproben und das Pyruvatverfahren als Methoden zur Messung der bakteriellen Stoffwechselleistungen eingegangen werden.

2.3.1. Reduktionsproben

Die Reduktionsproben zeigen Veränderungen des Redoxpotentials, die meist über Bildung reduzierender Stoffwechselprodukte von Bakterien verursacht werden. Aus dem Grad der Farbveränderung eines Redox-Indikators (z.B. Methylenblau, Resazurin) wird auf die Menge der Keime geschlossen (DEMETER, 1967). Die Aussagekraft der Reduktionsproben wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: Die verschiedenen Taxa der Mikroorganismen weisen Unterschiede in den Stoffwechselleistungen und damit im Reduktionsvermögen auf, durch die heute allgemein übliche Kühlung der Milch auf Temperaturen, die meistens unter 7°C liegen, kommt es zur Herabsetzung der Stoffwechselaktivität der mesophilen Flora sowie zu Verschiebungen in der Zusammensetzung der Keimflora. Eine überwiegend psychrotrophe Flora besitzt kaum noch reduzierende Eigenschaften (BUSSE, 1965; TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN, 1966). Aus Tabelle 3 ist die Abnahme der Korrelation zwischen der Reduktionsgeschwindigkeit und der Keimzahl mit zunehmender Kühlung der Milch und damit der mangelhafte Aussagewert der Reduktionsprobe bei gekühlter Milch ersichtlich.

Tabelle 3: Aussagekraft der Reduktionsprobe im Vergleich zur elektronischen Mikrokoloniezählung (EMZ) unter Berücksichtigung unterschiedlicher Milchkühlungen (nach HEESCHEN et al., 1969)

Art der Kühlung	Korrelationskoeffizienten (r) zwischen EMZ und Resazurinprobe	
	(EMZ linear)	(EMZ logarithmisch)
	r	r
keine	- 0,62	- 0,66
Wasser	- 0,42	- 0,60
Tauchkühler	- 0,32	- 0,38
Eiswasser	- 0,24	- 0,35
Kühlwanne	- 0,21	- 0,25

2.3.2. Pyruvatbestimmung

Pyruvat, das Salz der Brenztraubensäure, steht im Mittelpunkt der wichtigsten intermediären Stoffwechselvorgänge (Glykolyse, Lipolyse, Proteolyse). Der Stoffwechsel der Milchflora führt zur Bildung von Pyruvat in den Bakterienzellen und zum Übertritt zuviel gebildeten Pyruvats in die Milch (TOLLE et al., 1972). Damit kann das in der Milch vorhandene Pyruvat als Maß für die abgelaufenen Stoffwechselvorgänge dienen und nach TOLLE et al. (1972) auch eine Information über die inzwischen in der Milch mikrobiell bedingten Wertminderungen vermitteln. Die Bestimmung des Pyruvatgehaltes kann vollautomatisch in der kontinuierlichen Durchflußanalyse erfolgen. Dabei bedient man sich einer enzymatischen Analyse: Pyruvat wird durch Übertragung des Wasserstoffes vom reduzierten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) durch Lactatdehydrogenase (LDH) in Lac-

tat umgewandelt. Diese Reaktion ist sehr empfindlich und spezifisch (nur Spuren von β -Hydroxypyruvat werden erfaßt) und sie kann fluorometrisch bzw. photometrisch über die Abnahme des NADH erfaßt werden. Die Reaktion wird im alkalischen Bereich bei einem pH-Wert von 9,7 durchgeführt (TOLLE et al., 1972; STAHLHUT-KLIPP, 1975b).

Um die genaue Ermittlung des Pyruvatwertes über längere Zeit nach der Probenahme zu ermöglichen, ist die Konservierung der Milchprobe wichtig. Die Wahl des Konservierungsmittels oder -verfahrens richtet sich in erster Linie danach, ob ausschließlich der Pyruvatwert einer Milchprobe gemessen werden soll oder daneben auch andere Parameter von Interesse sind (HEESCHEN, SUHREN und TOLLE, 1977). So läßt sich eine Probe mit 3,5%igem Formalin (0,2 ml 3,5% Formalin auf 10 ml Milch) 48 Stunden (WERNERY, 1972) bzw. 24 Stunden (STAHLHUT-KLIPP, 1975a; SUHREN, HEESCHEN und TOLLE, 1976) ohne Beeinträchtigung der Pyruvatkonzentration fixieren. Aus einer solchen Probe können Pyruvat, somatische Zellen, Fett und Eiweiß bestimmt werden. Jedoch wurde inzwischen von BEYER und SPRINGMEYER (1978) berichtet, daß die Formalinfixierung eine zuverlässige Pyruvatbestimmung nicht einmal für eine Zeit von 24 Stunden ermöglicht. Für eine Kurzzeitkonservierung von vier bis fünf Stunden - ohne praktische Bedeutung - soll sich die Borsäurefixierung eignen (HEESCHEN et al., 1977). Ist lediglich der Parameter Pyruvat zu ermitteln und wird auf Langzeitfixierung bis zu sechs Tagen Wert gelegt, muß mit Trichloressigsäure (TCA) konserviert werden. Dabei werden TCA-Konzentrationen zwischen 5 und 50 % (z.B. 4 ml 50%ige TCA auf 56 ml Rohmilch) empfohlen (HEESCHEN et al., 1977; BEYER und SPRINGMEYER, 1978).

Bezüglich der Pyruvatbasiswerte in frisch ermolkenen Milch sind unterschiedliche Angaben bekannt: WERNERY (1972) gab Werte von 0,5 bis 3,0 ppm an, während SUHREN (1973) Werte zwischen 0,5 und 1,0 ppm ermittelte. Nach TOLLE (1973 a u. b) liegt der Pyruvatba-

siswert nicht über 0,5 ppm. Pyruvatwerte, die über dem physiologischen Basiswert liegen, sind nach HEESCHEN et al. (1974) auf mikrobielle Aktivität zurückzuführen. In diesem Zusammenhang wird wiederholt darauf hingewiesen, daß gerade unter Kühlagerung von Rohmilch mit den Psychrotrophen - insbesondere den Pseudomonaden - besonders aktive Pyruvatbildner in der Rohmilchflora auftreten (TOLLE, 1974; HEESCHEN, 1972).

Über die Pyruvatbildung verschiedener in Milch zu erwartender Mikroorganismen ist u. a. folgendes bekannt: Beimpft man sterile Rohmilchen mit Reinkulturen, z. B. von Pseudomonaden, Enterokokken, Coliformen oder Milchsäurestreptokokken und inkubiert diese bei 6°C, so zeigen die Pseudomonaden die größte Wachstumsrate und das stärkste Pyruvatbildungsvermögen. Milchsäurestreptokokken und Enterokokken sind unter diesen Bedingungen in Vermehrung und Pyruvatbildung wesentlich inaktiver. Sporenbildner bleiben sogar über mehrere Tage nahezu pyruvatinaktiv (TOLLE, 1974). AROLD (1977) untersuchte verschiedene Pseudomonadenstämme auf ihr Pyruvatbildungsvermögen in Milch und konnte dabei z. T. erhebliche Verzögerungsphasen in der Pyruvatbildung der Kulturen zu Beginn der Inkubation feststellen. Ein Pyruvatanstieg ließ sich oft erst nach 18 Stunden feststellen.

HEESCHEN et al. (1974) haben die je koloniebildende Einheit produzierte Menge Pyruvat errechnet, und sie geben folgende Näherungswerte an: Ist eine Anzahl koloniebildender Einheiten von 100 000/ml vorhanden, produziert jede Kolonie durchschnittlich 5×10^{-6} mcg Pyruvat, bei 1 Million Kolonien/ml bildet jede Einheit im Mittel 1×10^{-6} mcg Pyruvat. Die Differenzierung im unteren Keimzahlbereich ist also etwas ausgeprägter als bei hohen Keimzahlen. Untere Grenze, bei der ein bakteriell bedingter Anstieg des Pyruvats über den Basiswert der Rohmilch einsetzt, sind Keimzahlen von 50 000 bis 100 000/ml (HEESCHEN et al., 1974).

Die unterschiedliche Pyruvatbildungsaktivität der Keime kann Ursache für die von BRUNS (1976) festgestellten Ergebnisse sein, wonach eine Differenzierung der bakteriologischen Wertigkeit mit Hilfe des Pyruvatgehaltes in einem Keimzahlbereich von weniger als 10^6 /ml nicht möglich ist. AROLD (1977) kommt zu der Schlußfolgerung, daß man über den Pyruvatgehalt keine ausreichende Information hinsichtlich der Höhe der Keimbelastung von Milch erhält. Insbesondere konnte sie immer wieder Versuchsansätze mit hohen Keimzahlen und niedrigen Pyruvatwerten bzw. umgekehrte Verhältnisse feststellen. HACKEN-SCHMIED (1978) weist auf die erheblichen Verschiebungen zwischen Beurteilungen von Anlieferungsmilchproben nach dem Pyruvatgehalt und der Gesamtkeimzahlbestimmung bzw. dem Ergebnis der Reduktionsproben hin. UNGLAUB, LUBENOW und GERLACH (1978) bemängeln am Aussagewert des Pyruvatverfahrens, daß ein Gesamtkeimzahlbereich von 23×10^4 bis $1,56 \times 10^6$ Keimen/ml nur einem Pyruvatkonzentrationsbereich von 1,96 bis 2,59 ppm entspricht.

WIESNER (1975) sieht in der Beobachtung, daß die Pyruvatwerte der Rohmilch nicht konsequent mit dem für die Produktionshygiene relevanten Parameter "Coliforme" übereinstimmen, einen Mangel: Dadurch ist die Hygiene der Milchgewinnung mit der Pyruvatmethode nicht befriedigend zu erkennen.

Diesen z. T. erheblichen Nachteilen der Pyruvatbewertung für Rohmilch stehen vor allem technisch und wirtschaftlich interessante Vorteile gegenüber: Einerseits muß hervorgehoben werden, daß das Pyruvat als gelöste Substanz eine vereinfachte Probenahme, evtl. unter Verwendung automatischer Probenahmegeräte, ermöglicht (BEYER et al., 1978). Andererseits findet auch die vollautomatisierte Durchführung des Analysenverfahrens mit hoher Präzision und hoher Probenfrequenz besondere Beachtung. Insgesamt würden mit der Pyruvatmethode nur relativ geringe Kosten für die Bestimmung der bakteriologischen Wertigkeit von Anlieferungsmilch entstehen (NEITZKE,

1974). Nach Abwägung der Vor- und Nachteile kommt BUSSE (1977 a und b) zur Überzeugung, daß der Parameter Pyruvat bestenfalls als eine Übergangslösung betrachtet werden kann, die zwar von den wertlosen Reduktionsproben wegführt, jedoch früher oder später von einer automatisierten Keimzahlbestimmung abgelöst werden wird.

3. Eigene Untersuchungen

Die eigenen Untersuchungen sollten einen Beitrag zu der Frage leisten, inwieweit unterschiedliche Ausgangskeimzahlen und unterschiedliche Temperaturen die Pyruvatbildung durch Bakterien in Milch beeinflussen. Dazu wurden Versuche mit drei Pseudomonadenstämmen, deren Pyruvatbildungsvermögen schon von AROLD (1977) untersucht worden war, durchgeführt. Außerdem wurden drei Streptokokkenstämme in die Untersuchungen einbezogen. Ferner sollte geprüft werden, ob durch mechanische Zerstörung der Bakterienzellen in einer Zellaufbrechbombe eine Erfassung des gesamten Pyruvatgehaltes einer Keimpopulation, also auch des in den Bakterienzellen enthaltenen Pyruvates möglich ist, und ob dadurch eine objektivere und dem Gesamtkeimgehalt besser angenäherte Aussage erreicht werden kann.

3.1. Modellversuche zur Pyruvatbildung durch Mikroorganismen bei unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen und Temperaturen

3.1.1. Mikroorganismen und Nährböden

Aus der Gruppe der gramnegativen psychrotrophen Mikroorganismen wurden die von AROLD (1977) übernommenen Pseudomonadenstämme P_{10} , P_{11} und P_{13} in die Untersuchungen einbezogen. Diese Stämme waren aus Rohmilch isoliert worden. Ferner wurden von der Lehrstuhlsammlung *Sc. faecalis* (Sc_1), *Sc. faecium* (Sc_2) und *Sc. durans* (Sc_3) untersucht.

Zur Vorbereitung des Versuches wurden die genannten Stämme von Schrägagarkulturen auf je 50 ml sterile Nährbouillon (Nutrient Broth, Fa. Oxoid) überimpft und 12 Stunden bei 30°C angezüchtet. Zur Adaptation der Stämme an Milch wurde von dieser Nährbouillon mit einer ca. 0,02 ml fassenden Platinöse auf je 50 ml sterile Magermilch überimpft und erneut 12 Stunden bei 30°C bebrütet.

Alle Versuche - mit Ausnahme einiger Versuchsansätze zu 3.2. - wurden in hitzebehandelter, weitgehend keimfreier Vollmilch durchgeführt. Dazu wurde unmittelbar nach dem Morgen- oder Abendmelken eine Milchprobe direkt aus einem Milcherzeugerbetrieb geholt, der die Rohmilch in einem Sammel-tank bei ca. 4°C lagerte. Diese Rohmilch wurde in Portionen zu 150 ml in 250 ml fassende Babyflaschen gefüllt, 15 Minuten im Wasserbad auf 80°C erhitzt und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Je Versuchsansatz wurden 500 ml dieser hitzebehandelten Milch in 2000 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt.

Für einen Teil der Versuche zur Ermittlung des Pyruvatgehaltes nach mechanischer Zerstörung der Bakterienzellen in der Zellaufbrechbombe wurde Nährbouillon (Nutrient Broth, Fa. Oxoid) oder hitzebehandelte Vollmilch als Kulturmedium verwendet.

3.1.2. Versuchsanordnung

Reinkulturen der Stämme P_{10} , P_{11} , P_{13} und Sc_{1-3} sowie Kombinationen eines jeden Pseudomonadenstammes mit den einzelnen Enterostreptokokkenstämmen wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 4 inkubiert. Die Inkubation wurde bei Temperaturen von 4, 7 und 12°C durchgeführt. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl und des Pyruvatgehaltes erfolgte sofort nach Inokulation und danach in unterschiedlichen Zeitabständen und je nach Bebrütungstemperatur bis zu einer Gesamtzeit von 40 Stunden. Die unterschiedliche Anfangskeimdichte wurde dadurch erreicht, daß von jedem Stamm entsprechend der Gesamtkeimzahl der Vorkultur ein Versuchsansatz mit niedrigem (1-fachem), mittlerem (ca. 4-fachem) und hohem (ca. 20-fachem) Inokulum parallel angesetzt und bebrütet wurde. Bei allen Ansätzen erfolgte die erste Probenahme während der Inkubation nach 12 Stunden. Danach wurden bei 4°C Inkubation 21 und 40 Stunden, bei 7°C 18, 21 und z. T. 40 und bei 12°C 15, 18, 21 und z. T. 40 Stunden nach Inokulation Proben genommen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anordnung der Versuche (Temperatur, Versuchsdauer, Probeentnahmezeitpunkte) zur Pyruvatbildung der Pseudomonaden (P_{10} , P_{11} , P_{13}) und Fäkalstreptokokken (Sc_{1-3}) bei unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen

Temperatur (° C)	Versuchsdauer (Std.)	Probeentnahme nach (Std.)
4	40	0, 12, 21, 40
7	21 bzw. 40	0, 12, 18, 21, 40
12	21	0, 12, 15, 18, 21, 40

3.1.3. Keimzahl- und Pyruvatbestimmung

Die Keimzahlen wurden zu jedem Probeentnahmezeitpunkt mit dem Koch'schen Plattengußverfahren gemäß den Empfehlungen des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes (IDF, 1958) untersucht, mit dem Unterschied, daß das Nährmedium (Plate Count Agar, Fa. Oxoid) keinen Milchezusatz enthielt. Die Keimauszählung erfolgte makroskopisch.

Die Milchproben wurden mit Trichloressigsäure (TCA) nach den Empfehlungen von HEESCHEN et al. (1977) fixiert. Dazu wurden 3 ml 10%-iger TCA mit 6 ml der Milchprobe in ein steriles Reagenzglas gefüllt, der Inhalt gut durchmischt und das Reagenzglas verschlossen. Der Pyruvatgehalt wurde jeweils am Schluß einer Versuchsreihe im Auto-Analyzer-II-System (Fa. Technicon) entsprechend den Empfehlungen von STAHLHUT-KLIPP (1975 a und b) gemessen.

3.1.4. Ergebnisse

3.1.4.1. Pseudomonadenreinkulturen

Die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl- und Pyruvatbestimmungen während der Inkubation von Pseudomonadenreinkulturen (P_{10} , P_{11} , P_{13}) mit unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen gehen aus der Tabelle 5 und den Abbildungen 1 bis 7 hervor.

Danach lagen die Ausgangskeimzahlen (Tabelle 5) in den Pseudomonadenversuchsansätzen mit niedrigem Inokulum zwischen 22×10^3 (bei 4°C) und $370 \times 10^3/\text{ml}$ (bei 12°C). Beim mittleren Inokulum wurden zu Versuchsbeginn Keimzahlen zwischen 40×10^3 und $800 \times 10^3/\text{ml}$ (bei 4°C) ermittelt; beim hohen Inokulum lagen die Ausgangskeimzahlen zwischen 140×10^3 (bei 12°C) und $4,7 \times 10^6/\text{ml}$ (bei 7°C). Die Keimeinsaat wurde so gewählt, daß sich beim niedrigen Inokulum Ausgangskeimzahlen unter $400 \times 10^3/\text{ml}$, beim mittleren Inokulum solche zwischen 400×10^3 und $800 \times 10^3/\text{ml}$ und beim hohen Inokulum bis zu $4,7 \times 10^6/\text{ml}$ ergaben. Je nach Temperatur war nach Ablauf der Inkubationszeit eine mehr oder weniger starke Keimvermehrung festzustellen, wobei sich die Keimzahlen der niedrigen Inokula bei 4°C nach 40-stündiger Bebrütung bis auf $0,3 \times 10^6/\text{ml}$, die der mittleren Inokula zwischen $0,3 \times 10^6$ und $1,1 \times 10^6/\text{ml}$ und die der hohen Inokula sogar bis auf $6,6 \times 10^6/\text{ml}$ vergrößerten. Bei 7°C erreichte P_{10} mit niedrigem Inokulum nach 21 Stunden bereits $1,3 \times 10^6$ Keime/ml. Das mittlere Inokulum zeigte nach der gleichen Inkubationszeit einen Keimzuwachs auf $2,3 \times 10^6/\text{ml}$ und das hohe einen solchen auf $10,5 \times 10^6$. Noch deutlicher war die Keimvermehrung nach 40 Stunden bei 12°C : Hier wurden beim hohen Inokulum des Stammes P_{10} 345×10^6 Keime/ml festgestellt.

Die Pyruvatwerte der inokulierten Versuchsmilchen von insgesamt 24 Versuchsansätzen lagen bei 16 Ansätzen zwischen 1,0 und 2,0 ppm, bei sechs Ansätzen zwischen 2,0 und 3,0 ppm und bei zwei Ansätzen über 3,0 ppm (einmal bei 7,8 ppm und einmal bei 6,5 ppm). Die wei-

tere Entwicklung der Pyruvatwerte zeigte verschiedene Besonderheiten, die aus den folgenden Abbildungen hervorgehen. Auffälligerweise wurde bei drei der insgesamt 24 Ansätze (zwei bei 4°C: siehe Abb. 1 und 2 sowie ein weiterer bei 12°C: siehe Abb. 6) beim hohen Keimgehalt im Verlauf des Versuchs weniger Pyruvat gebildet, als bei den Ansätzen mit mittlerer Keimeinsaat. So erbrachte die Inkubation von P₁₀ bei 4°C (Abb. 1) bereits nach 12 Stunden mit mittlerem Inokulum bei einer Keimzahl von $1,1 \times 10^6$ /ml eine um 1,3 ppm höhere Pyruvatbildung, als mit hohem Inokulum bei einer Keimzahl von $1,2 \times 10^6$ /ml. Ebenfalls bei 4°C bewirkte der Stamm P₁₁ (Abb. 2) beim hohen Inokulum ($3,0 \times 10^6$ Keime/ml) schon nach 20 Stunden um 0,7 ppm geringere Pyruvatzunahmen (ausgehend allerdings von einem Anfangswert von 7,7 ppm), als beim mittleren Inokulum mit einem Ausgangskeimgehalt von $4,8 \times 10^6$ Keimen/ml.

Eine deutliche Verzögerungsphase in der Pyruvatbildung war beim niedrigen und mittleren Inokulum des Stammes P₁₃ bei 4°C (Abb. 3) in den ersten 12 Stunden des Versuches festzustellen; bis zu Versuchsende schloß sich eine allmählich beginnende Pyruvatfreisetzungsphase von 1,6 ppm auf 3,0 ppm (bei niedriger Keimeinsaat bzw. auf 4,6 ppm bei mittlerer Keimeinsaat) an. Nur das hohe Inokulum bewirkte eine gleichmäßige Pyruvatzubildung: von 1,7 ppm zu Versuchsbeginn bis auf 7,6 ppm nach 40 Stunden.

Ganz anders stellte sich die Pyruvatentwicklung des Stammes P₁₀ bei 7°C (Abb. 4) dar. Ausgehend von Pyruvatwerten zwischen 1,5 und 2,5 ppm zu Versuchsbeginn drückte sich die verschieden hohe Keimeinsaat auch sehr klar in einer entsprechend unterschiedlichen Pyruvatbildung aus: Die niedrige Einsaat steigerte die Pyruvatbildung im Verlauf von 21 Stunden nur um 2,5 ppm auf 4,0 ppm, während die mittlere Einsaat eine Pyruvatzunahme um 8,4 ppm auf 10,2 ppm und die hohe sogar eine Zunahme um 11,7 ppm auf 13,6 ppm bewirkte.

Der Pyruvatwert des Stammes P₁₁ lag bei 7°C (Abb. 5) und geringer

Keimeinsaat zu Versuchsende mit 9,5 ppm um 0,5 ppm höher, als derjenige der mittleren Einsaat. Bei 12°C war beim Stamm P₁₁ (Abb. 6) mit niedriger Keimeinsaat im Verlauf von 40 Stunden auch nur eine geringe Pyruvatzunahme zu ermitteln. Dagegen resultierten aus mittlerer und hoher Einsaat nach einer Verzögerungsphase von 12 bzw. 18 Stunden deutliche Pyruvatsteigerungen im weiteren Versuchsverlauf, nämlich auf 7,5 ppm bei mittlerem Inokulum nach 40 Stunden bzw. auf 7,0 ppm beim hohen Inokulum nach 40 Stunden. Ähnlich wie schon bei den Stämmen P₁₀ und P₁₁ bei 4°C, wurde auch hier im Versuchsverlauf bei hohem Keimgehalt weniger Pyruvat gebildet, als im Versuchsansatz mit mittlerer Keimeinsaat.

Der Stamm P₁₃ zeigte bei 12°C (Abb. 7) ausgehend von 1,2 ppm ähnlich wie schon bei 4°C bis zur 10. Stunde in den Ansätzen mit niedrigem und mittlerem Inokulum eine verzögerte Pyruvatbildung. Zwischen der zehnten und 21. Stunde nach Versuchsbeginn konnten bei allen drei Inokula starke Pyruvatzunahmen von ca. 5,0 ppm festgestellt werden. Gegen Versuchsende nahmen diese Steigerungsraten allmählich ab und die Pyruvatwerte stellten sich in den Versuchsmilchen zwischen 7,5 ppm (niedriges Inokulum) und 9,5 ppm (hohes Inokulum) ein.

Tabelle 5: Keimzahlen von Pseudomonadeninkulturen (P_{10} , P_{11} , P_{13}) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Inokula sowie Bebrütungstemperaturen und -zeiten

Inokulum des Stammes	Keimzahlen in den Versuchsansätzen					
	4° C	7° C		12° C		
	nach Inokula- tion X 10 ³ /ml	nach 40 Std. X 10 ⁶ /ml	nach Inokula- tion X 10 ³ /ml	nach 21 Std. X 10 ⁶ /ml	nach Inokula- tion X 10 ³ /ml nach 40 Std. X 10 ⁶ /ml	
- niedrig	70	0,2	90	1,3	370	143
P ₁₀ - mittel	800	1,1	260	1,1	420	21
- hoch	210	1,5	800	0,5	2450	345
- niedrig	22	0,15	100	0,4	29	49
P ₁₁ - mittel	485	1,1	700	2,3	110	41
- hoch	3000	6,6	4650	10,5	140	49
- niedrig	31	0,3			35	148
P ₁₃ - mittel	40	0,3	n.d.	n.d.	410	214
- hoch	325	0,3			550	n.d.

n. d. = nicht durchgeführt

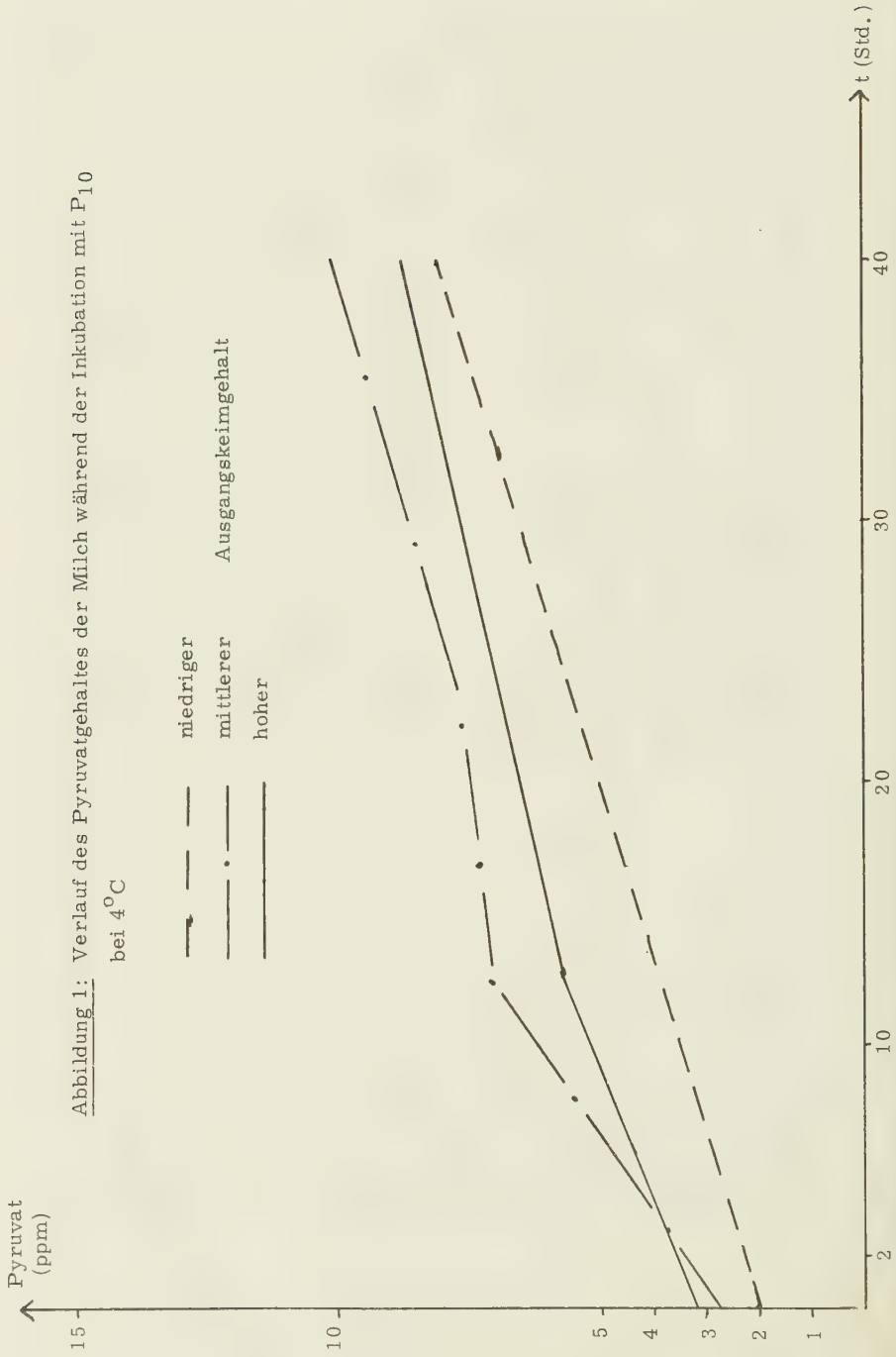
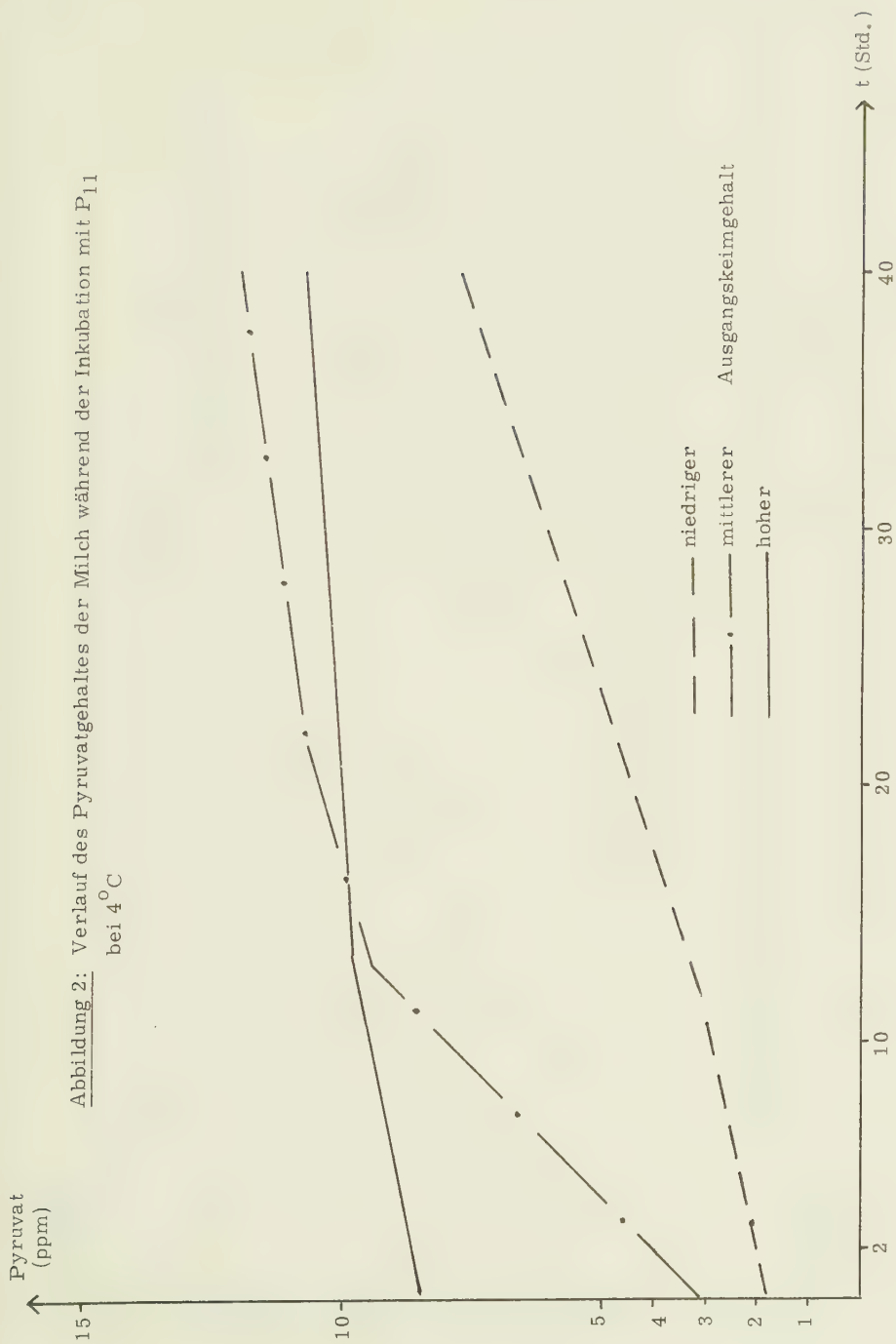


Abbildung 2: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während der Inkubation mit P₁₁
bei 4°C



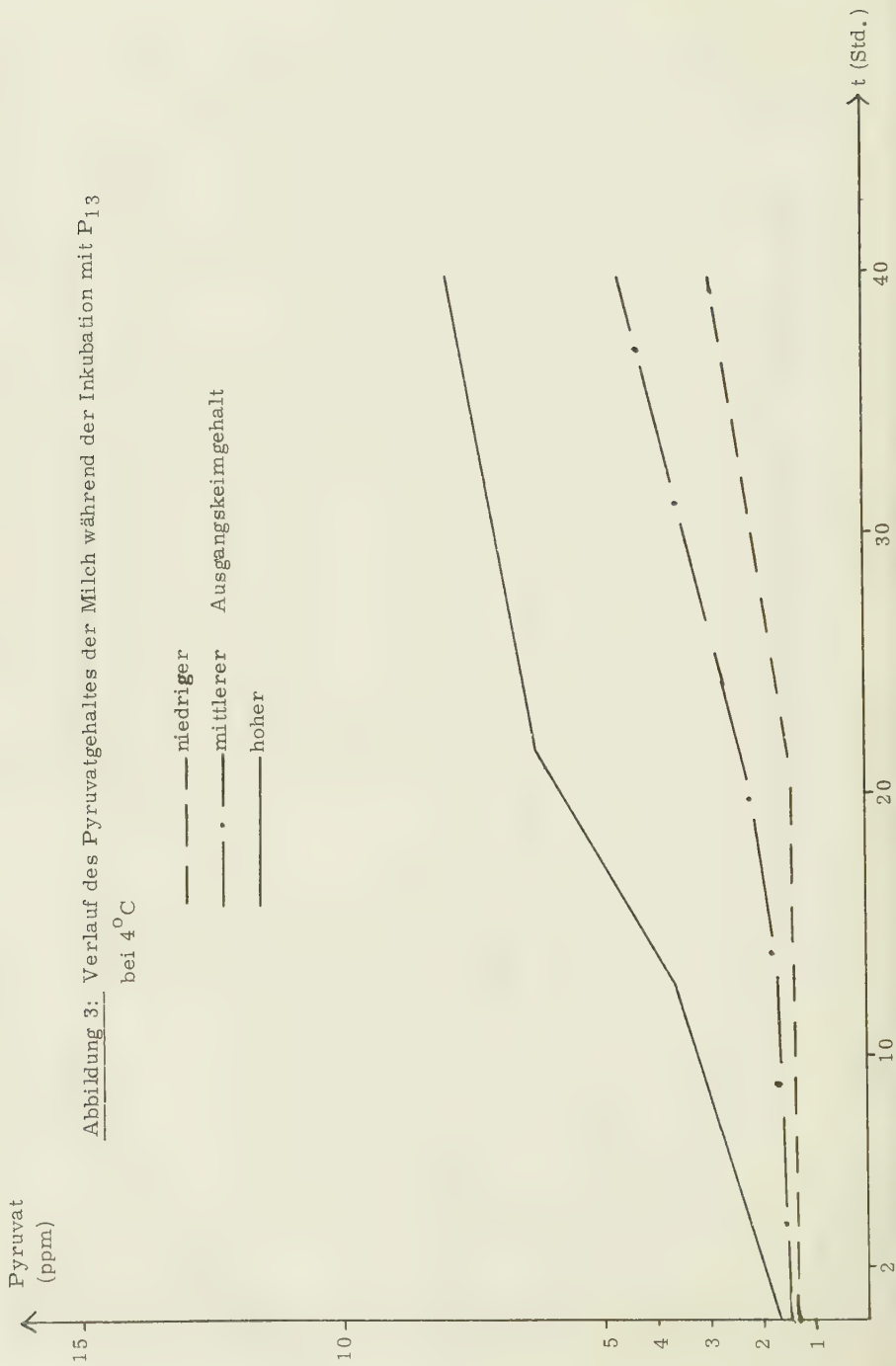


Abbildung 4:
Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während
der Inkubation mit P_{10} bei 7°C

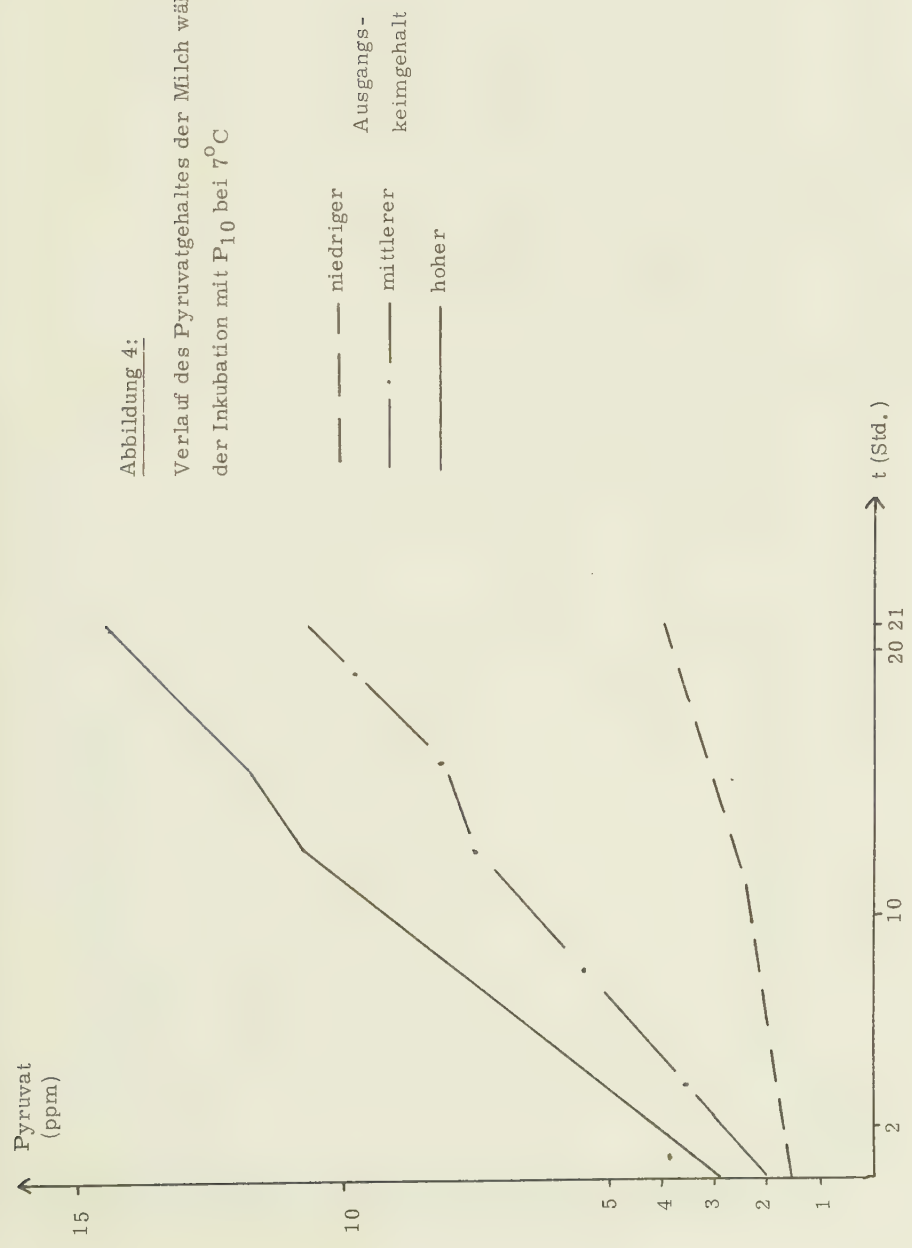


Abbildung 5:
Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während
der Inkubation mit P_{11} bei 7°C

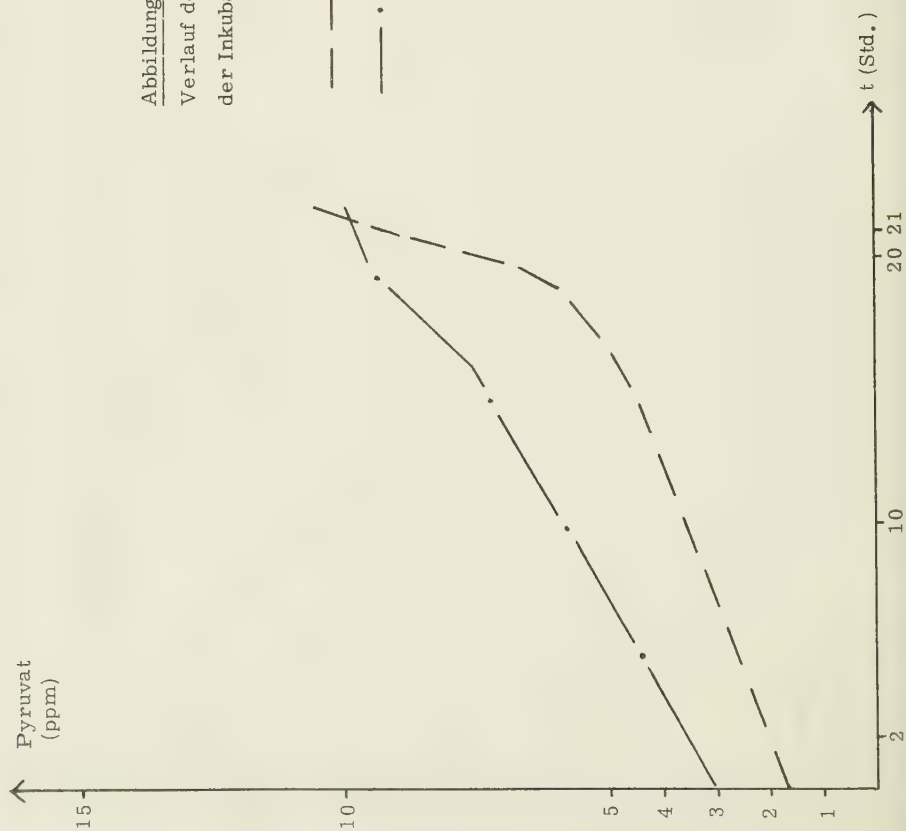
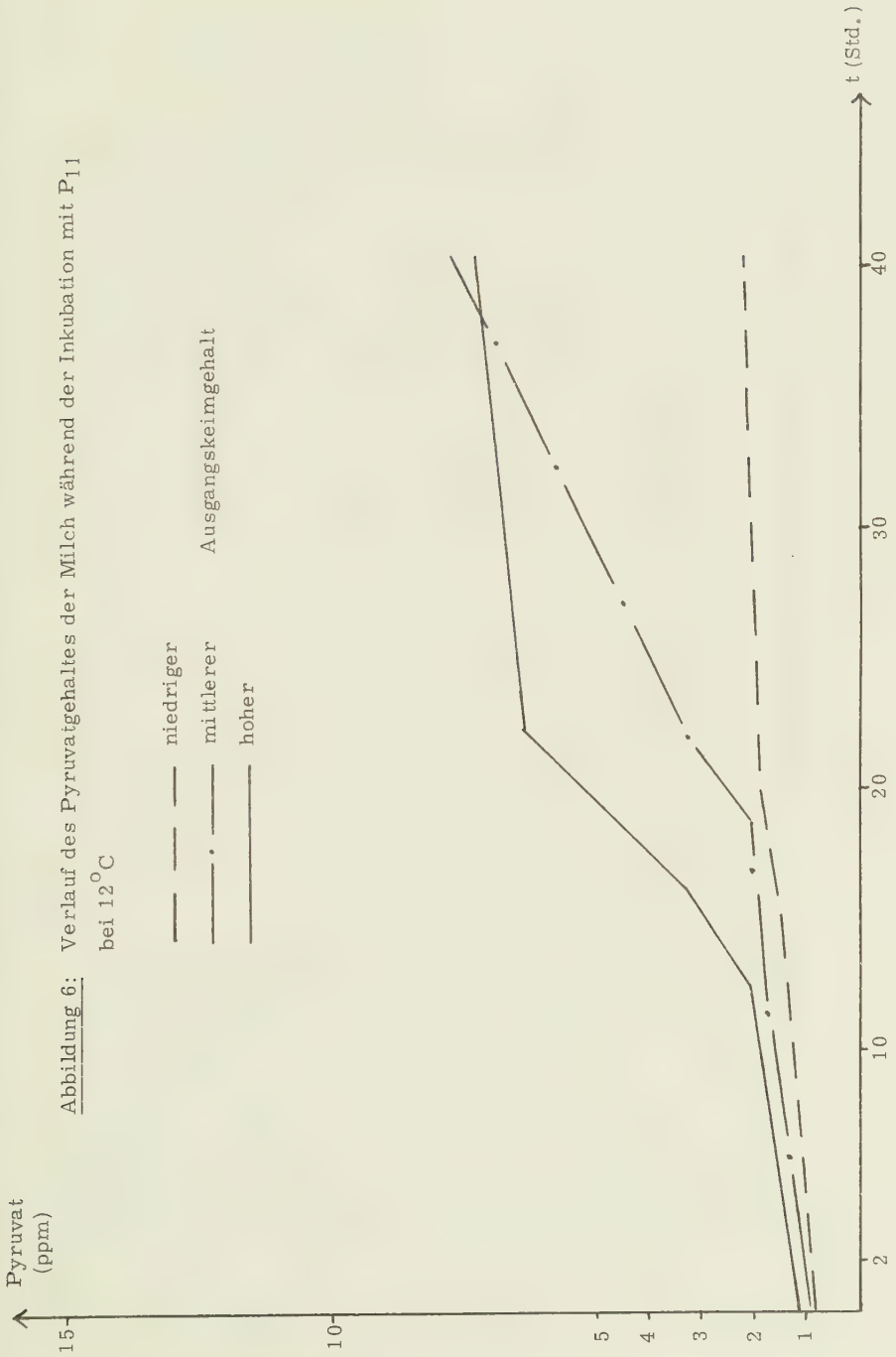
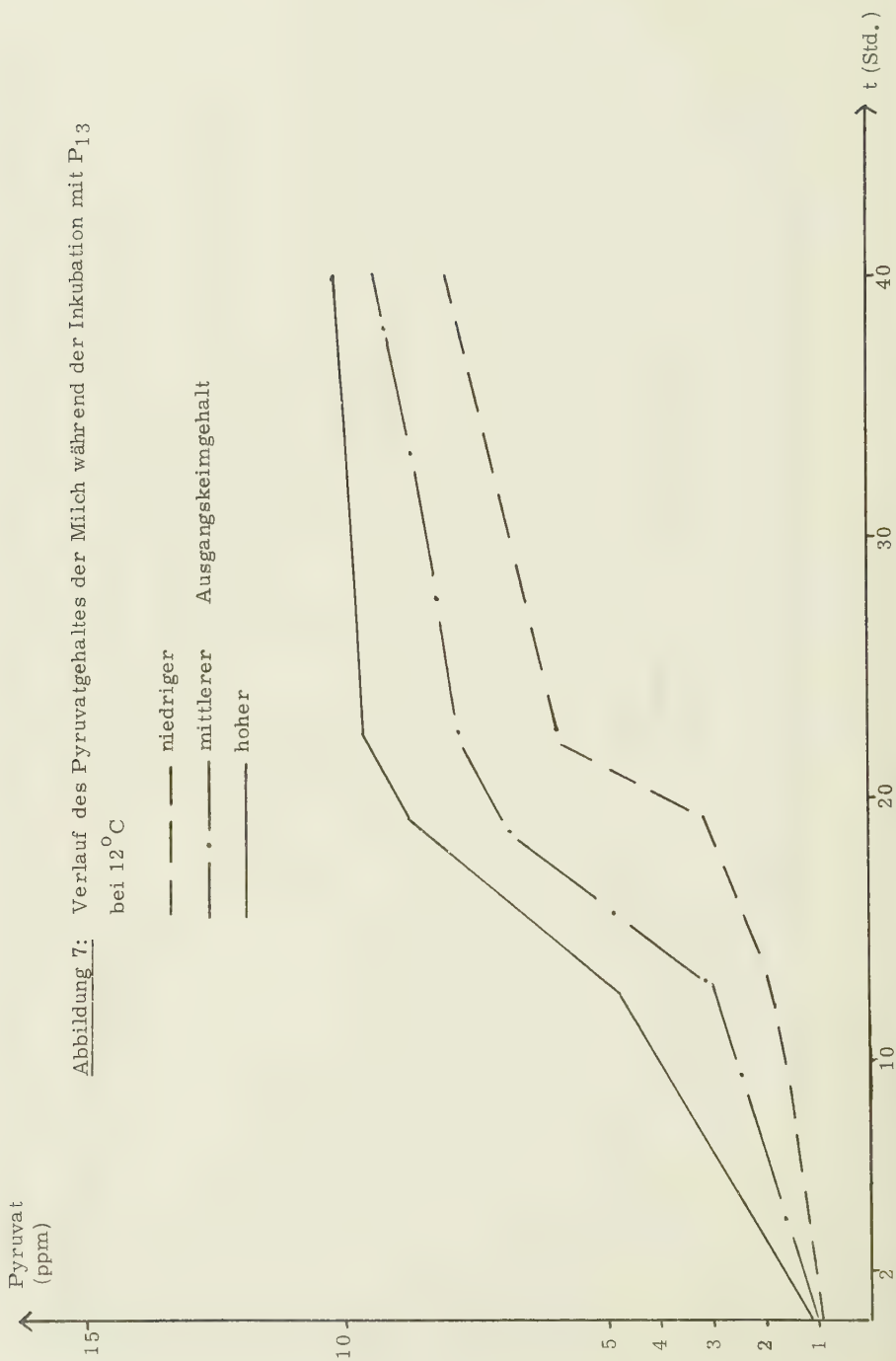


Abbildung 6: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während der Inkubation mit P_{11} bei 12°C





3.1.4.2. Streptokokkenreinkulturen

Die Ergebnisse der Keimzahl- und Pyruvatbestimmungen während der Inkubation von Streptokokkenreinkulturen (Sc_1 - Sc_3) mit unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen gehen aus Tabelle 6 und den Abbildungen 8 bis 12 hervor.

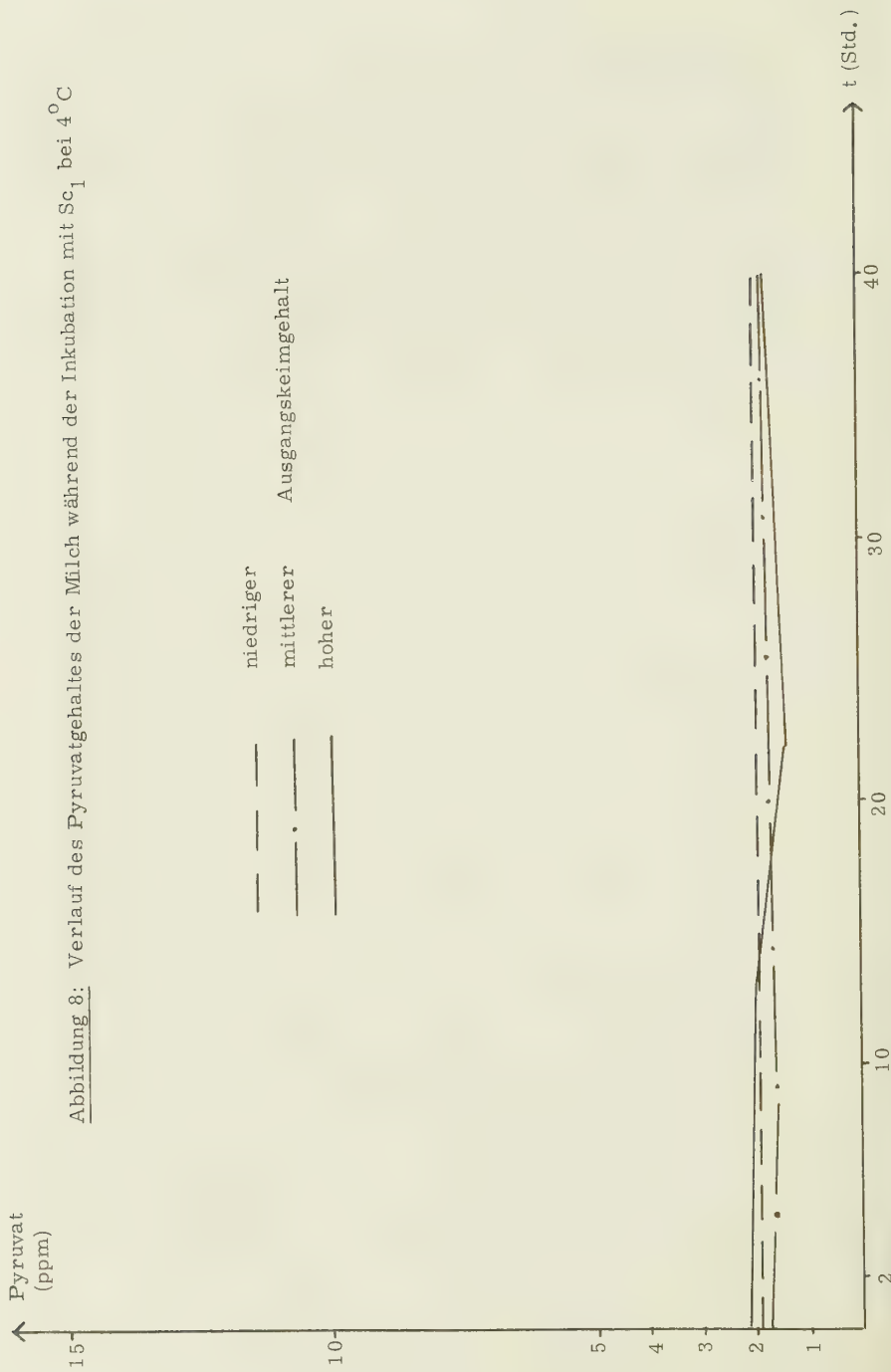
Die Ausgangskeimzahlen/ml in den Streptokokkenversuchsansätzen mit niedrigem Inokulum lagen demnach zwischen $2,7 \times 10^3$ (bei $7^\circ C$) und 187×10^3 (bei $12^\circ C$). Beim mittleren Inokulum wurden zu Versuchsbeginn Keimzahlen zwischen $7,2 \times 10^3$ (bei $7^\circ C$) und 880×10^3 (bei $12^\circ C$) ermittelt; bei hohem Inokulum lagen die Ausgangskeimzahlen zwischen 42×10^3 und $3,5 \times 10^6$ (bei $12^\circ C$). Die entsprechenden Keimzuwachsraten nach 21- bzw. 40-stündiger Bebrütung bei 4, 7 und $12^\circ C$ gehen aus Tabelle 6 hervor. Nach Abschluß der Inkubationszeit hatte bei $4^\circ C$ der Ansatz mit dem hohen Inokulum von Sc_2 mit $4,9 \times 10^6$ Keimen/ml die stärkste Zunahme. Allgemein stärkere Zunahmen wurden bei $7^\circ C$ ermittelt: Hier erreichte ebenfalls Sc_2 (hohes Inokulum) einen Endwert von $7,7 \times 10^6$ Keimen/ml. Die stärkste Keimvermehrung konnte nach 21-stündiger Inkubation bei $12^\circ C$ erzielt werden. Hier lagen die Keimzahlen bei Versuchsende zwischen $0,7 \times 10^6$ /ml (niedriges Inokulum von Sc_3) und $23,8 \times 10^6$ /ml (hohes Inokulum von Sc_1).

Die Pyruvatausgangswerte der inokulierten Milchproben lagen zwischen 0,9 und 2,2 ppm und veränderten sich im Versuchsverlauf in 21 von 26 Ansätzen nur unwesentlich (siehe Abb. 8 bis 12), obwohl in dieser Zeit eine Keimvermehrung um ca. eine Zehnerpotenz festgestellt werden konnte. Bei $4^\circ C$ Bebrütungstemperatur nahm die Pyruvatkonzentration von Sc_1 im Verlauf von 40 Stunden um 0,7 ppm ab (Abb. 8). Bei $7^\circ C$ konnte weder bei niedriger Keimeinsaat ($2,7 \times 10^3$ /ml) noch bei höherer Einsaat (42×10^3) bis zu Versuchsende eine Veränderung des Pyruvatgehaltes der Milch durch Sc_1 registriert werden. Sc_2 bewirkte bei 4 und $7^\circ C$ (Abb. 10) im Pyruvatgehalt sowohl Zu- als auch Abnahmen um 0,2 bis 0,3 ppm. Bei $12^\circ C$ zeigte Sc_2 (Abb. 11)

Tabelle 6: Keimzahlen von Streptokokkenreininkulturen (Sc_{1-3}) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Inokula sowie Bebrütungstemperaturen und -zeiten

Inokulum des Stammes	Keimzahlen in den Versuchsansätzen					
	4° C	7° C		12° C		
	nach Inokula- tion X 10 ³ /ml	nach 40 Std. X 10 ⁶ /ml	nach Inokula- tion X 10 ³ /ml	nach 21 Std. X 10 ⁶ /ml	nach 40 Std. X 10 ⁶ /ml	
Sc ₁	- niedrig	44	0, 2	2, 7	0, 02	187
	- mittel	275	0, 4	7, 2	0, 09	880
	- hoch	860	2, 3	42	0, 3	3500
Sc ₂	- niedrig	64	0, 2	72	0, 4	64
	- mittel	142	1, 0	300	1, 0	300
	- hoch	895	4, 9	900	7, 7	1200
Sc ₃	- niedrig	41	0, 05	43	0, 01	50
	- mittel	135	0, 3	119	0, 4	150
	- hoch	117	1, 3	860	1, 3	1000

mit einer Ausgangskeimzahl von $1,2 \times 10^6$ /ml beim hohen Inokulum nach 21 Stunden einen Pyruvatzuwachs um 1,0 ppm. Sc_3 verminderte den Anfangspyruvatgehalt der Milch bei Keimzahlen von 41×10^3 /ml (niedriges Inokulum) nach 40-stündiger Lagerung bei 4°C um 0,6 ppm (Abb. 9). Bei 12°C konnte zum gleichen Zeitpunkt im Versuchsansatz mit $1,0 \times 10^6$ Keimen/ml (hohes Inokulum) ein Pyruvatanstieg von 2,2 ppm beobachtet werden (Abb. 12). Die Pyruvatentwicklung der Stämme Sc_2 (bei 4°C), Sc_1 und Sc_3 (bei 7°C) sowie von Sc_1 und Sc_3 (bei 12°C) entsprach den in Abb. 8 bis 12 dargestellten Kurven.



Pyruvat
(ppm)

Abbildung 9: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während der Inkubation mit Sc_3 bei 4°C

————— niedriger
 ————— mittlerer
 ————— hoher

Ausgangskonzentration



Pyruvat
(ppm)

Abbildung 10: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während der Inkubation mit Sc_2 bei 7°C

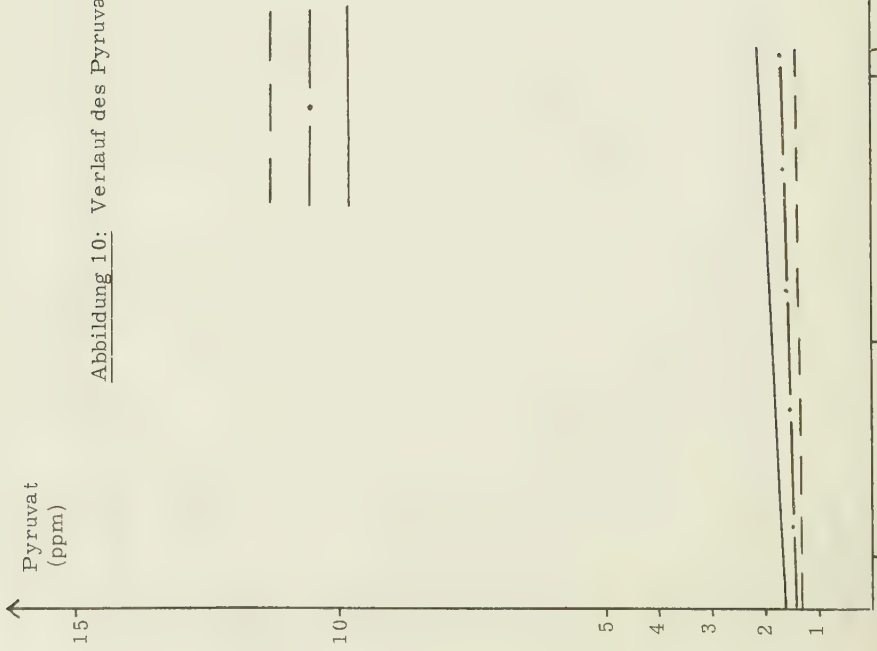
niedriger
mittlerer
hoher
Ausgangskemigehalt

t (Std.)

20 21

10

2



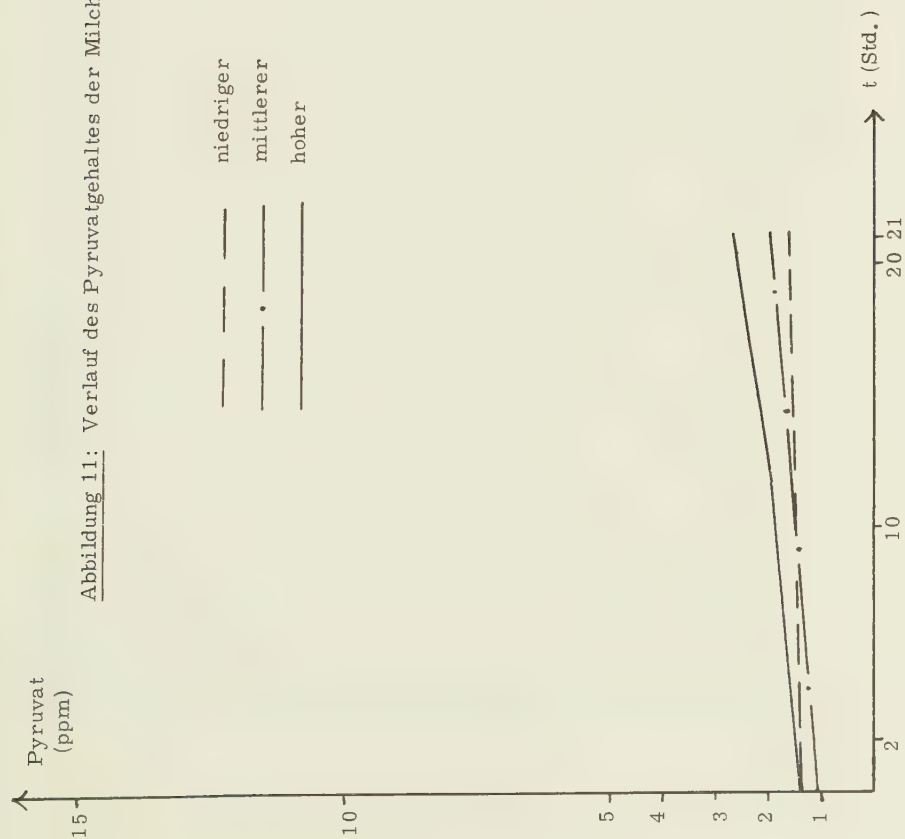
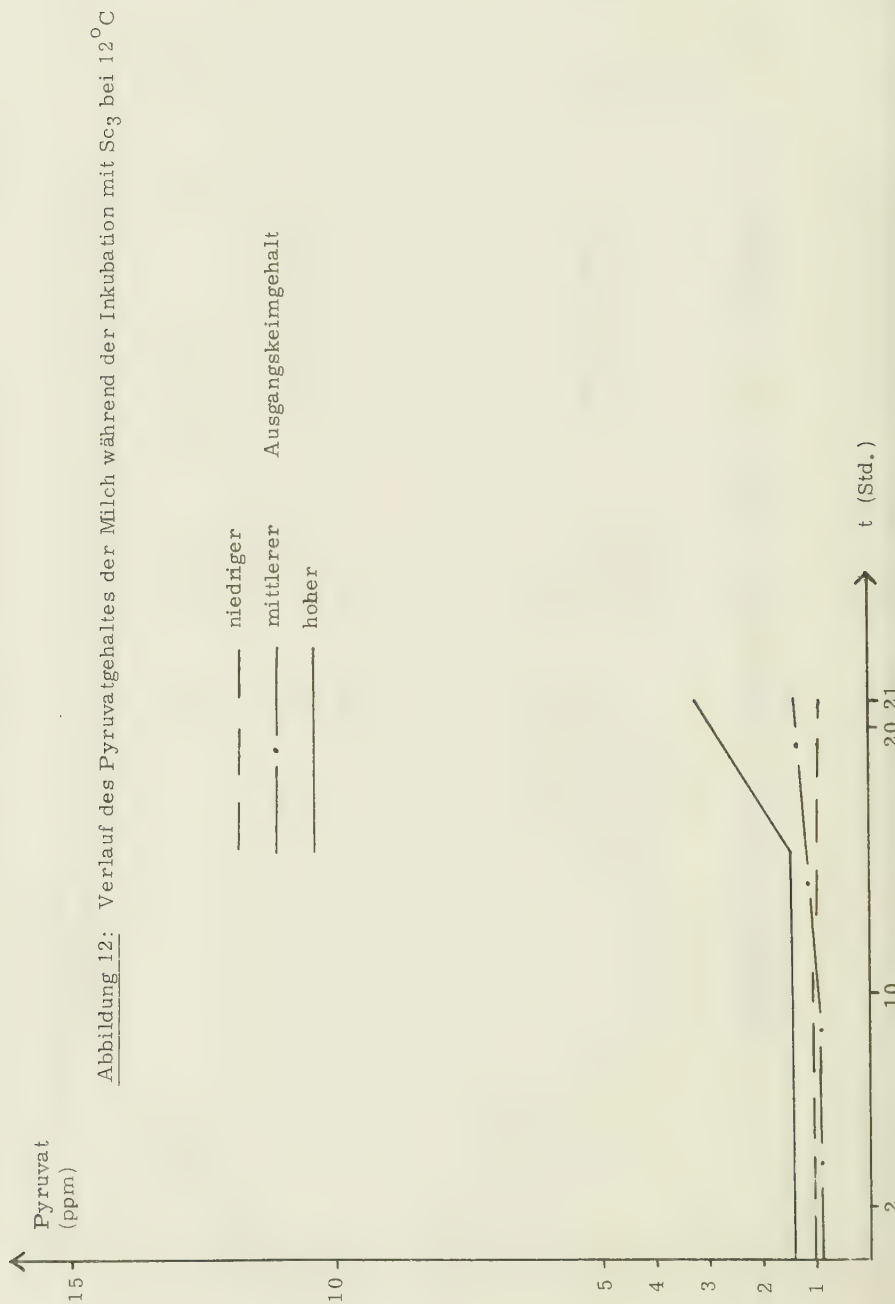


Abbildung 11: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während der Inkubation mit Sc_2 bei 12°C



3.1.4.3. Mischkulturen aus Pseudomonaden- und Streptokokkenstämmen

Die Ergebnisse der Gesamtkeimzahl- und Pyruvatbestimmungen nach Inkubation der Mischkulturen aus Pseudomonaden- und Streptokokkenstämmen bei verschiedenen Temperaturen gehen aus Tabelle 7 und 8 hervor.

Die Gesamtkeimzahlen zu Versuchsbeginn lagen zwischen 13×10^3 und $3,6 \times 10^6$ /ml. Dabei waren die Mischkulturen so inokuliert worden, daß die Streptokokken einen Anteil von etwa einem Drittel und die Pseudomonaden einen Anteil von ca. zwei Dritteln der Keime (koloniebildende Einheiten) bildeten. Im Versuchsverlauf kam es bei 4°C nur in drei Ansätzen zu geringgradigen Keimzunahmen, während bei den übrigen vier Mischkulturen nach 40 Stunden sogar weniger Keime wuchsen, als zu Versuchsbeginn. Bei 7°C kam es nach 40 Stunden nur bei einer Mischkultur zu geringen Keimabnahmen, während bei den übrigen Ansätzen Zunahmen auf Werte zwischen 0,02 und $5,8 \times 10^6$ Keimen/ml zu messen waren. Das stärkste Keimwachstum trat bei 12°C auf: Hier stieg innerhalb von 21 Stunden bei allen neun untersuchten Keimmischungen die Keimzahl um eine bis zwei Zehnerpotenzen auf Endwerte zwischen $0,8 \times 10^6$ und $7,5 \times 10^6$ /ml an. Die Pyruvatausgangswerte der inokulierten Versuchsmilchen lagen bei 25 Ansätzen zwischen 0,7 und 2,2 ppm, in einem Fall bei 7°C wurden zu Versuchsbeginn 3,0 ppm gemessen. In der Versuchszeit über 21 bzw. 40 Stunden war bei 14 Ansätzen (56%) keine wesentliche Veränderung des Pyruvatgehaltes der Milch zu ermitteln, obwohl in dieser Zeit Gesamtkeimzahlen von mehreren Hunderttausend bis zu mehreren Millionen/ml nachgewiesen werden konnten. Die übrigen Ansätze zeigten mehr oder weniger deutlichen Pyruvatanstieg im Versuchsverlauf. So bewirkten die insgesamt sieben bei 4°C durchgeführten Versuche fast keine Veränderung des Pyruvatgehaltes über die Beobachtungszeit von 40 Stunden. In drei dieser Ansätze sank der Pyruvatgehalt nach 40 Stunden sogar um 0,5 ppm. Bei 7°C konnten in vier Ansätzen geringe Pyruvatschwankungen ge-

messen werden, während die restlichen fünf Ansätze bereits innerhalb der ersten zwölf Stunden eine deutliche Pyruvatzunahmen aufwiesen, wobei Werte von 7,2 ppm nach 21 Stunden erreicht wurden. Bei 12^oC konnten nach 21-stündiger Bebrütung in sechs Ansätzen deutliche, in einem weiteren nur eine geringe und in zwei Ansätzen überhaupt keine Pyruvatkonzentrationserhöhung gemessen werden.

Tabelle 7: Keimzahlen in Mischkulturen aus Pseudomonaden- und Streptokokkenstämmen in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Keimgemisch	Keimzahlen in den Versuchsansätzen			
	4° C nach Inokulation X 10 ³ /ml	nach 40 Std. X 10 ⁶ /ml	7° C nach Inokulation X 10 ³ /ml	12° C nach 40 Std. nach Inokulation X 10 ³ /ml X 10 ⁶ /ml
Sc ₁	3400	3, 3	980	190
P ₁₀ + Sc ₂	3600	3, 4	640	73
Sc ₃	2370	3, 7	1400	650
Sc ₁	n. d.	n. d.	13	50
P ₁₁ + Sc ₂	595	0, 18	480	167
Sc ₃	n. d.	n. d.	278	248
Sc ₁	103	0, 16	193	43
P ₁₃ + Sc ₂	66	0, 15	80	305
Sc ₃	455	0, 4	260	46

n. d. = nicht durchgeführt

3.2. Untersuchung des Pyruvatgehaltes in Kulturen nach mechanischer Zerstörung der Bakterienzellen mittels Zellaufbrechbombe

Mit einer 'Cell Disruption Bomb' (Fa. Parr Instruments Company, Moline Illinois, U.S.A.) wurden die Bakterien mechanisch desintegriert, um dadurch Pyruvat freizusetzen. Die Bakterienzertrümmerungsversuche wurden in Anlehnung an die Untersuchungen von FRASER (1951) durchgeführt.

3.2.1. Mikroorganismen und Nährböden

Dem Zellaufbrechverfahren wurden folgende Stämme unterzogen: Von den Pseudomonaden die Stämme P_{10} , P_{11} , P_{13} , von den Fäkalstreptokokken die Stämme *Sc. faecium* ($Sc._2$) und *Sc. durans* ($Sc._3$). Zusätzlich wurde *E. coli* geprüft. Die Versuchsvorbereitungen waren die gleichen wie unter 3.1.1., jedoch wurden die Keime nicht in steriler Magermilch adaptiert.

Die erste Versuchsreihe wurde direkt mit den Kulturen von P_{10} , P_{11} , P_{13} , $Sc._2$, $Sc._3$ und *E. coli* in Nährbouillon (Nutrient Broth, Fa. Oxoid) durchgeführt. In der zweiten Versuchsreihe diente hitzebehandelte Vollmilch als Kulturmedium. In der dritten Versuchsreihe wurde frische unbehandelte Rohmilch mit der originären Flora dem Zellaufbrechverfahren unterzogen.

3.2.2. Prinzip und Anordnung der Versuche

Die Zellaufbrechbombe besteht aus einem Edelstahlzylinder mit Deckel und Verschlußring, dem Eintauchrohr mit aufgesetztem Manometer sowie dem Ablassrohr. Der Zylinder faßt 920 ml und dient als Druckbehälter. Durch das Einlaßventil wird schnell eine große Menge Stickstoff in den Bombenzylinder, in dem sich die zu behandelnde Probe befindet, eingelassen. Ein Manometer, das mit einer Stickstoffflasche in Verbindung steht, kontrolliert den N_2 -Zustrom. Unter

sehr hohem Druck (117,3 bar) wird Stickstoff in den Bakterienzellen gelöst. Durch plötzliches Druckabsenken nimmt das Volumen des Stickstoffs spontan um ein Vielfaches zu, so daß es zur Überdehnung und zum Aufbrechen der Zellmembranen kommt und der Zellinhalt freigesetzt wird.

Die Zellaufbrechversuche wurden in drei verschiedenen Versuchsreihen durchgeführt, die sich durch das zu behandelnde Material sowie durch verschieden lange und häufige Stickstoffüberdruckbehandlung voneinander unterscheiden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht über die Versuche mit der Zellaufbrechbombe (Kulturmedien, Bakterienstämme sowie Häufigkeit und Dauer der N₂-Behandlung; Druck: 117,3 bar)

Versuchsreihe	Kulturmedium	Bakterienstämme	N ₂ -Behandlung in der Zellaufbrechbombe Häufigkeit x Zeit (Min.)
1	Nährbouillon	P ₁₀ , P ₁₁ , P ₁₃ Sc ₂ , Sc ₃ E.coli	2 x 1 bzw. 3 3 x 1 " 3 2 x 1, 3 bzw. 10 3 x 1 2 x 1, 3 bzw. 10 3 x 1
2	hitzebehandelte Vollmilch	P ₁₀ , P ₁₁ , P ₁₃	2 x 1 bzw. 3 3 x 1 " 3
3	Rohmilch	originäre Flora	2 x 1 bzw. 3 3 x 1 " 3

In der ersten Versuchsreihe wurden N₂-Überdruckversuche mit Bakterien in Nährbouillon durchgeführt. Dabei wurden die Stämme Sc₂

und Sc_3 , *E.coli* sowie P_{10} , P_{11} und P_{13} verwendet. Jeweils 20 ml der beimpften Nährbouillon wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und in der Zellaufbrechbombe verschieden lang und wiederholt unter hohem N_2 -Druck (117,3 bar) gesetzt und danach jeweils plötzlich dekomprimiert. Vor und nach der N_2 -Überdruckbehandlung wurde die Gesamtkeimzahl und der Pyruvatgehalt gemessen. Die zweite Versuchsreihe bestand aus N_2 -Überdruckversuchen mit Bakterienkulturen in hitzebehandelter Vollmilch. In der dritten Versuchsreihe wurde schließlich Rohmilch der N_2 -Überdruckbehandlung unterzogen. Neben der Gesamtkeimzahl und dem Pyruvatgehalt (3.1.3.) wurde hier auch die Zellzahl vor und nach der Stickstoffbehandlung mit der von HEESCHEN et al. (1972) beschriebenen Methode in der automatischen Durchflußanalyse im Auto-Analyzer-II-System (Fa. Technicon) ermittelt.

3.2.3. Ergebnisse

In den Tabellen 10 bis 13 sind die Auswirkungen der Behandlung von Bakterienkulturen in Nährbouillon, der hitzebehandelten Vollmilch und von Rohmilch mit der Zellaufbrechbombe auf den Pyruvatgehalt der Nährmedien zusammengefaßt.

3.2.3.1. Pseudomonaden- und Streptokokkenkulturen in Nährbouillon

Vor der Behandlung lagen die Keimzahlen/ml der in Nährbouillon angezüchteten Pseudomonadenkulturen für den Stamm P_{10} bei 23×10^6 , für P_{11} bei 52×10^6 und für P_{13} bei 23×10^6 (Tabelle 10). Beim Stamm Sc_2 wurden vor der Behandlung 54×10^6 , bei Sc_3 62×10^6 und bei *E.coli* 161×10^6 Keime/ml ermittelt (Tabelle 11). Nach der Behandlung war z. T. ein deutlicher Rückgang der Keimzahlen zu ermitteln: Zwischen 4 % (P_{11} nach 3 x 3 Min.) und 86 % (P_{13} nach 2 x 3 Min.) der vor der Behandlung in der Stickstoffbombe vorhandenen koloniebildenden Einheiten konnten zerstört werden. Die N_2 -Überdruckbehandlung mit anschließender Dekompression führte bei Sc_2 und Sc_3 in fünf von sieben

Ansätzen zu einer Reduzierung von 4 bis 27 %, während es bei zwei Ansätzen zu einer Vermehrung der koloniebildenden Einheiten um 18 bzw. 62 % kam. Bei *E. coli* zeigten zwei Ansätze nach der Behandlung Keimabnahmen um 4 bzw. 37 %, während zwei weitere Zunahmen der koloniebildenden Einheiten aufwiesen (Tabelle 11). Hinsichtlich des Pyruvatgehaltes der Kulturflüssigkeit konnte folgendes festgestellt werden: Die Pseudomonaden zeigten ausgehend von 8,7 ppm (P_{10}) bzw. 5,6 ppm (P_{11}) bzw. 4,9 ppm (P_{13}) vor der Behandlung deutliche Pyruvatzunahmen zwischen 2,5 ppm (P_{11} nach 2×1 Min.) und 5,7 ppm (P_{10} nach 3×3 Min.) nach der Behandlung.

3.2.3.2. Pseudomonaden- und Streptokokkenkulturen in hitzebehandelter Vollmilch

Die Ergebnisse der Behandlung in der Zellaufbrechbombe von den Pseudomonadenkulturen P_{10} , P_{11} und P_{13} in hitzebehandelter Vollmilch sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Die Keimzahlen/ml lagen vor der Behandlung zwischen 7×10^6 (P_{11}) und 90×10^6 (P_{10}), die P_{13} -Kultur enthielt 20×10^6 Keime/ml. Nach der Überdruckbehandlung sanken die Keimzahlen/ml in zehn von zwölf Ansätzen auf Werte zwischen $0,4 \times 10^6$ (P_{13}) und 59×10^6 (P_{10}). Im Versuchsverlauf ergaben sich Reduzierungen koloniebildender Einheiten von 1 % (P_{13} nach 3×3 Min.) bis zu 80 % (P_{13} nach 2×1 Min.), während beim Stamm P_{11} in zwei Ansätzen eine Vermehrung um 36 bzw. 60 % festzustellen war.

Die Pyruvatwerte der drei Pseudomonadenstämme lagen nach der Behandlung zwischen 2,1 ppm (P_{13}) und 4,5 ppm (P_{10}). Bei allen drei untersuchten Stämmen kam es dabei zu einer Zunahme der Pyruvatwerte: Beim Stamm P_{10} bis zu 2,0 ppm, bei P_{11} bis zu 0,6 ppm und bei P_{13} bis zu 1,4 ppm. In Anbetracht der Versuchsdauer von 8 Stunden wurden auch die unbehandelten Proben nach dieser Zeit erneut auf den Pyruvatgehalt geprüft. Dabei zeigten bis zu Versuchsende auch diese Proben Pyruvatzunahmen um 1,8 ppm (P_{10}), 0,7 ppm (P_{11}) und 1,2 ppm (P_{13}), wie aus Tabelle 12 hervorgeht.

Tabelle 10: Einfluß der Behandlung von Pseudomonadenkulturen in Nährbouillon in der Zellaufbrechbombe (N_2 -Druck 117,3 bar) auf Pyruvatkonzentration und Keimzahl

Stamm (Ausgangs- keimzahl/ml)	N_2 -Behand- lung in der Zellaufbrech- bombe Häu- figkeit x Zeit (Min.)	Pyruvatge- halt (ppm)	Differenz zwischen Keimzahlen vor und nach der Behand- lung (in %)
P_{10} (23×10^6)	ohne Be- handlung	8,7	0
	2 x 1	12,7	- 25
	2 x 3	12,4	- 45
	3 x 1	15,0	- 65
	3 x 3	14,4	- 59
P_{11} (52×10^6)	ohne Be- handlung	5,6	0
	2 x 1	8,1	- 16
	2 x 3	8,4	- 80
	3 x 1	8,4	- 72
	3 x 3	9,3	- 4
P_{13} (23×10^6)	ohne Be- handlung	4,9	0
	2 x 1	7,5	- 58
	2 x 3	7,8	- 86
	3 x 1	7,9	- 66
	3 x 3	8,1	- 44

Tabelle 11: Einfluß der Behandlung von Streptokokkenkulturen und E.coli in Nährbouillon in der Zellaufbrechbombe (N₂-Druck 117,3 bar) auf Pyruvatkonzentration und Keimzahl

Stamm (Ausgangs- keimzahl/ml)	N ₂ -Behand- lung in der Zellauf- brechbombe Häufigkeit x Zeit (Min)	Pyruvat- gehalt (ppm)	Differenz zwischen Keimzahlen vor und nach der Behand- lung (in %)
Sc ₂ (54 x 10 ⁶)	ohne Behand- lung	0,5	0
	2 x 1	0,5	- 24
	2 x 3	0,4	- 4
	2 x 10	0,4	- 9
	3 x 1	0,4	- 27
Sc ₃ (62 x 10 ⁶)	ohne Behand- lung	2,2	0
	2 x 1	1,5	+ 62
	3 x 1	1,2	- 5
	2 x 3	1,3	+ 18
E.coli (161 x 10 ⁶)	ohne Behand- lung	0,5	0
	2 x 1	0,5	+ 10
	2 x 3	0,6	- 37
	2 x 10	0,9	- 4
	3 x 1	0,3	+ 27

Tabelle 12: Einfluß der Behandlung von Pseudomonadenkulturen in hitzebehandelter Vollmilch in der Zellaufbrechbombe (N₂-Druck 117,3 bar) auf Pyruvatkonzentration und Keimzahl

Stamm (Ausgangs- keimzahl/ml)	N ₂ -Behand- lung in der Zellaufbrech- bombe Häu- figkeit x Zeit (Min.)	Pyruvat- gehalt (ppm)	Differenz zwischen Keimzahlen vor und nach der Behand- lung (in %)
P ₁₀ (90 x 10 ⁶)	ohne Behand- lung	2,5	0
	2 x 1	4,3 (3,3) ^x	- 45
	2 x 3	4,6 (3,7) ^x	- 44
	3 x 1	4,5 (3,9) ^x	- 34
	3 x 3	4,5 (4,3) ^x	- 53
P ₁₁ (7 x 10 ⁶)	ohne Behand- lung	3,4	0
	2 x 1	3,3 (3,7) ^x	+ 60
	2 x 3	3,6 (3,9) ^x	+ 36
	3 x 1	3,6 (3,9) ^x	- 18
	3 x 3	4,0 (4,1) ^x	- 41
P ₁₃ (20 x 10 ⁶)	ohne Behand- lung	1,9	0
	2 x 1	2,1 (1,8) ^x	- 80
	2 x 3	2,8 (2,7) ^x	- 25
	3 x 1	2,7 (3,1) ^x	- 55
	3 x 3	3,3 (n.d.)	- 1

x = Pyruvatgehalt ohne N₂-Behandlung nach entsprechender Lagerung der Ansätze.

n.d. = nicht durchgeführt.

3.2.3.3. Rohmilch mit originärer Flora

Um einen Überblick über die Auswirkungen der Zellaufbrechbombenbehandlung auf verschiedene Rohmilchparameter (Gesamtkeimzahl, Pyruvatgehalt, Zellzahl) zu erhalten, wurden vier Versuchsreihen mit jeweils frischer Rohmilch durchgeführt. Dabei wurden 20 Versuchsansätze verschieden lang und verschieden häufig in der Zellaufbrechbombe behandelt (Tabelle 13).

Die Gesamtkeimzahlen/ml der untersuchten Rohmilchproben lagen vor der Behandlung zwischen 126×10^3 (Rohmilchprobe 1) und $1,1 \times 10^6$ (Rohmilchprobe 3). Nach der Behandlung wurden in 19 von 20 Versuchsansätzen Reduzierungen der koloniebildenden Einheiten von 3 bis 50 % gegenüber den unbehandelten Proben gemessen. Nur in einem Versuchsansatz wurde eine Vermehrung um 40 % festgestellt. Die Pyruvatwerte der unbehandelten Rohmilchproben lagen bei allen vier Rohmilchversuchsgruppen zwischen 0,9 und 1,0 ppm. Nach Behandlung blieben sie bei achtzehn von zwanzig Ansätzen weitgehend unverändert, d.h. es wurden Schwankungen von $\pm 0,4$ ppm gegenüber der unbehandelten Probe ermittelt. Lediglich bei zwei Ansätzen kam es zu erhöhter Pyruvatfreisetzung um 0,7 bzw. 0,8 ppm (Tabelle 13, Rohmilchprobe 3).

Auch die Zellzahlen blieben in 16 Ansätzen nach der Behandlung uneinflusst, während es bei den restlichen vier Ansätzen zu einer Erhöhung um ca. 250 bis 350×10^3 Zellen/ml kam.

Tabelle 13: Einfluß der Behandlung von Rohmilch in der Zellaufbrech-
bombe auf Pyruvatkonzentration, Keimzahl und Zellzahl

Rohmilch- probe (Ausgangs- keimzahl/ml)	N ₂ -Behandlung in der Zellauf- brechbombe Häufigkeit x Zeit (Min.)	Pyruvatgehalt (ppm)	Differenz zwi- schen Keimzah- len vor und nach der Behandlung (in %)	Zellzahl x 10 ³ /ml
1 (126 x 10 ³)	ohne Be- handlung	0,9	0	100
	2 x 1	1,1	- 11	"
	2 x 3	1,1	- 30	"
	2 x 10	1,2	- 25	"
	3 x 1	1,2	- 36	"
	3 x 3	1,2	- 19	"
	3 x 10	1,3	- 23	"
2 (830 x 10 ³)	ohne Be- handlung	1,0	0	200
	2 x 1	1,0	- 11	"
	2 x 3	1,0	- 23	"
	2 x 10	1,0	- 17	"
	3 x 1	1,3	- 19	"
	3 x 3	1,2	- 24	"
	3 x 10	1,0	- 14	"
3 (1,1 x 10 ⁶)	ohne Be- handlung	1,0	0	400
	2 x 3	1,2	- 28	700
	2 x 10	1,8	- 3	750
	3 x 3	1,3	- 8	750
	3 x 10	1,7	+ 40	650
4 (700 x 10 ³)	ohne Be- handlung	0,9	0	250
	2 x 1	1,1	- 14	270
	2 x 3	0,9	- 29	200
	3 x 1	1,2	- 17	250
	3 x 3	1,1	- 50	200

4. Diskussion

Noch immer wird in den meisten Bundesländern die bakteriologische Untersuchung im Rahmen der Gütebewertung der Rohmilch mittels Reduktionsproben durchgeführt. Als einen möglichen Ersatz dieser infolge der verbreiteten Kühlung nicht mehr zeitgemäßen Methode zur Ermittlung des mikrobiologischen Status von Anlieferungsmilch wird seit Jahren die Bestimmung des Pyruvatgehaltes als Ausdruck des bakteriellen Metabolismus diskutiert. Diese inzwischen technisch relativ weit ausgereifte Methode (STAHLHUT-KLIPP, 1975a und b) bietet bei geringem Aufwand für die Probenahme, hoher Probenfrequenz und guter Präzision der Messung (SUHRE N, HEESCHEN, TOLLE, 1978) ein hohes Maß an Wirtschaftlichkeit (NEITZKE, 1974; HAISCH, SCHEBLER, SCHORR, 1976; HACKENSCHMIED, 1978). Diesen Vorteilen der Pyruvatbestimmungsmethode haftet aber gegenüber praktisch allen anderen Verfahren zur Ermittlung der mikrobiologischen Wertigkeit von Rohmilch der bedeutende Nachteil an, daß die Interpretation der Pyruvatwerte, insbesondere wenn die Gesamtkeimzahl als Vergleichsmaßstab zugrunde gelegt wird, nicht zu befriedigenden Gütebewertungen führen kann. So weist häufig Rohmilch mit höheren Keimzahlen ($> 500\,000/\text{ml}$) zu einem erheblichen Anteil (ca. 60 bis 70 % in Untersuchungen von GROVE und TERPLAN, 1977) einen relativ geringen Pyruvatgehalt auf. Aber auch eine Differenzierung von Milchproben, die weniger als 10^6 Keime/ml enthalten, ist mit der Pyruvatmethode nicht möglich (BRUNS, 1976).

Um eine Erklärung für die unterschiedliche Pyruvatfreisetzung durch die Rohmilchflora zu bekommen, wurden in den eigenen Untersuchungen je drei Pseudomonaden- und Streptokokkenstämme mit unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen auf Pyruvatbildung in Milch geprüft. Auch der Effekt von Keimkombinationen in Hinsicht auf gegenseitige Beeinflussung dieser sechs Stämme wurde getestet. Schließlich war von Interesse, ob eine Pyruvatfreisetzung durch Zertrümmerung der Bakte-

rienzellen mittels Dekompression nach Stickstoffüberdruckbehandlung in einer Zellaufbrechbombe möglich ist und inwieweit dadurch eventuell eine engere und konstantere Beziehung zwischen Pyruvatgehalt und Gesamtkeimzahl im Nährmedium Milch festzustellen ist.

Der Verlauf von Gesamtkeimzahl und Pyruvat beim Wachstum von Rein- kulturen in Milch zeigte bei den drei Pseudomonadenstämmen P_{10} , P_{11} und P_{13} mit zunehmender Temperatur (4, 7 bzw. 12°C) zunehmendes Keimwachstum. Die verschieden großen Keimeinsaatn machten sich nur in der Gesamtkeimzahl direkt nach Inokulation bemerkbar, während nach 21- bzw. 40-stündiger Inkubation nicht in jedem Fall auf die Menge des Inokulums zu Versuchsbeginn geschlossen werden konnte.

In der Pyruvatbildung konnte beim Stamm P_{11} (Abb. 6, 12°C) bei mittlerem und hohem Inokulum sowie bei P_{13} (Abb. 3, 4°C) beim geringen und mittleren Inokulum in den ersten 12 bis 18 Stunden eine deutliche Verzögerungsphase festgestellt werden. AROLD (1977) sowie ZANDSTRA und de VRIES (1977) ermittelten in ihren Untersuchungen ähnliche Verzögerungen in der Pyruvatbildung von Mikroorganismen, die während einer längeren Lagerungszeit anhielten. Allerdings war in den eigenen Untersuchungen und auch in denen von AROLD (1977) parallel zu diesen Verzögerungen in der Pyruvatbildung z. T. auch relativ geringes Keimwachstum festzustellen. Ein Vergleich von Keimzahlen und Pyruvatwerten in verschiedenen anderen Versuchsansätzen, die keine Pyruvatverzögerungsphase zeigten, läßt jedoch erkennen, daß häufig keinerlei Beziehungen zwischen Pyruvatgehalt und Gesamtkeimzahl bestehen: So korrespondierte ein Ansatz mit 22×10^3 Keimen/ml (Tabelle 5, P_{11} bei 4°C) mit einem Pyruvatgehalt von 1,8 ppm; bei einem anderen Versuch mit 260×10^3 Keimen/ml (d.h. nur eine Zehnerpotenz mehr) wurden 8,3 ppm Pyruvat festgestellt (P_{10} bei 7°C, mittleres Inokulum). Der Extremfall trat beim Stamm P_{11} (12°C) auf: Bei niedriger Keimeinsaat mit nur 29×10^3 /ml und 1,0 ppm Pyruvat waren nach 40-stündiger Inkubation 49×10^6 Keime/ml und nur 2,5 ppm Pyruvat vor-

handen, ELBERTZHAGEN und MENNINGER (1977) ermittelten in Rohmilch, die zum Teil mit UHT-Milch versetzt war, erst nach zwei bis drei Tagen Lagerung bei 5°C steigenden Pyruvatgehalt, obwohl die Keimzahlen in der gleichen Zeit kontinuierlich angestiegen waren.

Der Einfluß des Anfangskeimgehaltes auf die Pyruvatfreisetzung von psychrotrophen Mikroorganismen wird zusammenfassend in Tabelle 14 am Beispiel der Versuche bei einer Temperatur von 4°C dargestellt. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Inokula wurden die arithmetischen Mittel der durch die Stämme P₁₀, P₁₁ und P₁₃ bei 4°C gebildeten Pyruvatmengen und die Untersuchungszeiten zusammengestellt.

Tabelle 14: Mittlerer Pyruvatzuwachs in einzelnen Zeitabschnitten nach Inkubation der Stämme P₁₀, P₁₁, P₁₃ bei 4°C unter Verwendung unterschiedlicher Anfangskeimzahlen

Ausgangs- keimgehalt	Pyruvatzuwachs (ppm) nach Inkubation von		
	0 - 12 Std.	0 - 21 Std.	0 - 40 Std.
niedrig	1,0	1,9	4,4
mittel	3,3	4,1	6,0
hoch	1,7	2,9	4,3

Danach ergibt sich z.B. bei niedriger Ausgangskeimzahl eine durchschnittliche Pyruvatzunahme von 1,0 ppm innerhalb von zwölf Stunden bzw. eine solche von sogar 4,4 ppm nach 40 Stunden Lagerungszeit. Für mittlere Ausgangskeimzahlen liegen die entsprechenden Zuwachsraten wesentlich höher (bis 6,0 ppm). Bemerkenswert erscheint die relativ geringe durchschnittliche Pyruvatbildung der geprüften Stämme bei Verwendung hoher Ausgangskeimzahlen. Sie übertrifft mit 1,7 ppm bei zwölf Stunden zwar die durchschnittliche Pyruvatsteigerung bei niedriger Keimeinsaat, ist jedoch wesentlich kleiner, als der entsprechende Wert bei

mittlerer Keimeinsaat (3,3 ppm). Ähnliche Verhältnisse ergaben sich für die Untersuchungszeit von 21 bzw. 40 Stunden. Diese Studie zeigt, daß mit Hilfe des Pyruvatgehaltes von Milch nicht auf das Keimzahlniveau zu Beginn der Lagerung geschlossen werden kann.

Bei den Versuchen mit Streptokokkenreinkulturen in hitzebehandelter Vollmilch wurde zwar in allen 27 Ansätzen (bei 4, 7 und 12°C; Tabelle 6; Abb. 8 bis 12) deutliches Keimwachstum (bis zu $4,9 \times 10^6$ Keime/ml) festgestellt, jedoch war nur in einer Kultur (bei 12°C nach 21 Stunden) der Pyruvatgehalt deutlich erhöht worden (um 1,8 ppm). Damit kann angenommen werden, daß in Milch, deren Flora vermehrt Streptokokken enthält, während der Lagerung im landwirtschaftlichen Milcherzeugerbetrieb nicht mit wesentlichen Erhöhungen des Pyruvatgehaltes gerechnet werden kann. Die zusätzlichen eigenen Untersuchungen an Mischkulturen aus Pseudomonaden und Streptokokken bestätigen diese Schlußfolgerung. Unter den insgesamt 25 Versuchsansätzen konnte in 56 % aller Fälle keine deutliche Pyruvatkonzentrationserhöhung festgestellt werden (Tabelle 8), obwohl auch hier in den meisten Kulturen kontinuierlich Keimzahlerhöhungen erreicht wurden. Da aus arbeitstechnischen Gründen eine selektive Bestimmung von Pseudomonaden bzw. Streptokokken nicht durchgeführt werden konnte, ist eine detailliertere Auswertung dieser Versuchsergebnisse nicht möglich. Allerdings ergibt sich aus den Beobachtungen von SUHREN, HEESCHEN und TOLLE (1978), daß nämlich eine vermehrt glykolytische Flora in Milch hinsichtlich der Erfassung über die Pyruvatmessung ungünstiger zu bewerten ist, - eine Bestätigung unserer Versuchsergebnisse.

Um die Möglichkeit zu prüfen, ob aus den Bakterienzellen durch Zellertrümmerung in das umgebende Substrat Pyruvat abgegeben wird, wurden die drei Pseudomonadenstämme und zwei Streptokokkenstämme sowie ein E.coli-Stamm nach Anzüchtung in Nährbouillon bzw. Milch einer Stickstoffüberdruckbehandlung (bei 117,3 bar) mit nachfolgender spontaner Dekompression ausgesetzt. Dabei erwiesen sich eine zweimalige Behandlung für jeweils eine oder drei Minuten bzw. eine drei-

mal dreiminütige Behandlung als besonders wirksam für die Zerstörung von Bakterienzellen: 4 bis 86 % der vor der Behandlung vorhandenen Keime wurden zertrümmert. Nur in 16 % der Versuchsansätze wurde eine Vermehrung der koloniebildenden Einheiten um bis zu 62 % erreicht. Obwohl im allgemeinen eine relativ hohe Berstrate in den Kulturen erzielt worden war, kam es nicht zu einer Beeinflussung des Pyruvatgehaltes der Kulturflüssigkeiten. Wenn auch die Tabellen 10 bis 12 z.T. eine Erhöhung des Pyruvatgehaltes nach der Stickstoffüberdruckbehandlung ausweisen, so darf nicht übersehen werden, daß gerade bei diesen Untersuchungen in der für die verschiedenen Versuche notwendigen Zeit von ca. zwei bis acht Stunden eine bakteriell bedingte Pyruvatzunahme festzustellen war. Dies wurde durch Leerwertuntersuchungen bestätigt (Tabelle 12).

Ganz deutlich wird die Beobachtung, daß die Zelldesintegration den Pyruvatgehalt der Kulturflüssigkeiten unbeeinflusst läßt, an den eigenen Untersuchungen mit Rohmilch, die bei 4°C gelagert wurde. Selbst bei Rohmilch, die $1,1 \times 10^6$ Keime/ml als originäre Flora enthielt, wurde durch die Behandlung in der Stickstoffbombe kein Effekt auf den Pyruvatgehalt erzielt.

Damit haben die Zellaufbrechversuche gezeigt, daß sich dabei weder in Reinkulturen von milchhygienisch relevanten Mikroorganismen in Nährbouillon oder in Milch, noch bei originärer Flora in Rohmilch eine bessere Vergleichbarkeit von Pyruvatgehalt und Gesamtkeimzahl ergibt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der Pyruvatgehalt der Milch als Qualitätsparameter weder eine Auskunft über den mikrobiologischen Status der Milch sofort nach dem Milchentzug, noch über den aktuellen bakteriologischen Zustand der Rohmilch zuläßt. BRUNS (1976) sowie ZANDSTRA und de VRIES (1977) stellten fest, daß z.B. bei der Anlieferungsmilch nach Lagerung über 48 Stunden eine hohe Anfangskeimzahl durch die Pyruvatmethode nicht mehr erfaßt werden kann. Nach AROLD (1977) läßt sich bereits nach ca. 18-stündiger Lagerung trotz starkem Keim-

wachstum über den Parameter Pyruvat keine deutliche Qualitätsminderung der Milch feststellen. Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß bei niedriger Temperatur die Pseudomonaden bei gutem Keimwachstum wenig Pyruvat bilden und daß oftmals sehr hohe Anfangskeimzahlen zu weniger Pyruvatfreisetzung führen, als niedrigere. Gerade diese Gattung hat jedoch am Gesamtgehalt der psychrotrophen Flora in gekühlter Milch einen Anteil von ca. 50 % (NAKANISHI et al., 1967); NAKAE, 1970), z.T. sogar von 80 bis 90 % (NAKANISHI und TANABE, 1970). Da die Milch heute bereits beim Erzeuger und auch auf dem Weg bis zum Verbraucher durchweg gekühlt wird, ist es damit möglich, unhygienische Produktions- und Verarbeitungsverhältnisse zu verstecken. Neben den Pseudomonaden konnten auch die Reinkulturen von Streptokokken, also von Mikroorganismen, die in nicht gekühlter Milch einen erheblichen Anteil haben, über das Pyruvat schwer erfaßt werden, obwohl das Keimwachstum bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen gut war. Die neueren Veröffentlichungen von SUHREN, HEESCHEN und TOLLE (1978) bestätigen, daß eine überwiegend glykolytische Flora über die Pyruvatmessung schlecht erfaßt werden kann. Bezüglich einer Wertminderung der Rohmilch, die erhöhten Pyruvatgehalt aufweist, konnten bisher ebenfalls keine konkreten Angaben gemacht werden. BIERL, GROVE und TERPLAN (1978) stellten in diesem Zusammenhang jedoch fest, daß über den Parameter Pyruvatgehalt der Rohmilch in der Hartkäseproduktion keine Aussagen über die Verarbeitungsfähigkeit der Milch und die Qualität der daraus hergestellten Käse möglich sind.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen zeigen die eigenen Versuche, daß der Parameter Pyruvat hinsichtlich einer Gütebewertung der Milch bisher noch erhebliche Unsicherheiten bei der Interpretation der Ergebnisse in sich birgt. Das Pyruvatverfahren kann deshalb zur Zeit für die Bewertung der bakteriologischen Qualität bei der Rohmilchbezahlung nicht empfohlen werden. Wenn sich dennoch

einige Organisationen gegenwärtig mit Plänen beschäftigen, die Pyruvatmethode statt der Reduktionsprobe in die Gütebewertung einzuführen, so ist das zweifellos so zu verstehen, daß die Reduktionsproben speziell bei der gekühlten Milch unzuverlässiger sind als die Pyruvatbestimmung. Hinzu kommt, daß sich die Pyruvatmessung in den Ablauf der Probenentnahme und der automatisierten Untersuchung besser einfügen läßt, woraus zweifellos erhebliche organisatorische und wirtschaftliche Vorteile erwartet werden können.

5. Zusammenfassung

Nachdem die Messung des Pyruvatgehaltes zur Beurteilung der bakteriologischen Wertigkeit von Rohmilch wegen Widersprüchen zwischen der Konzentration dieses mikrobiellen Metaboliten und dem Keimgehalt Kritik erfahren hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Pyruvatbildung verschiedener Mikroorganismen in Milch differenziert zu erfassen. Dazu wurden die Reinkulturen von drei Pseudomonaden- und drei Streptokokkenstämmen unter Verwendung unterschiedlicher Anfangskeimzahlen auf ihr Pyruvatbildungsvermögen in Milch untersucht. Die Lagerung erfolgte bei 4, 7 und 12⁰ C über 21 bis 40 Stunden. Es konnte festgestellt werden, daß zwischen der Pyruvatbildung der Kulturen und ihren Anfangskeimzahlen kein Zusammenhang besteht. Ebenso war auch keine enge Beziehung zwischen Pyruvatbildung und Keimzahl der geprüften Kulturen zu ermitteln. Dies wurde insbesondere an Pseudomonadenkulturen deutlich, in denen bei nur geringer Keimzahl relativ hohe Pyruvatkonzentrationen bzw. umgekehrt festzustellen waren. Die Streptokokkenkulturen zeigten bis auf eine Ausnahme während der Versuchszeit keine bzw. nur geringe Pyruvatzunahmen. Die Mischkulturen aus Pseudomonaden und Streptokokken waren zu 56 % ebenfalls nicht in der Lage, die Pyruvatkonzentrationen in der Milch zu erhöhen.

Die Desintegration von Kulturen (Bouillon, erhitzter Milch und von Keimen in Vollmilch) durch Stickstoffüberdruckbehandlung und anschließende Dekompression erbrachte keine gesicherten Veränderungen der Pyruvatwerte, obwohl in den meisten Versuchen mit Berstraten zwischen 4 % und 86 % eine deutliche Reduzierung koloniebildender Einheiten nachzuweisen war. Insbesondere unter Zugrundelegung des Keimgehaltes als Vergleichsmaßstab können aufgrund der eigenen Untersuchungen erhebliche Bedenken gegen eine Beurteilung der bakteriologischen Wertigkeit der Rohmilch nach dem Pyruvatgehalt nicht beseitigt werden.

Summary

The pyruvate content of raw milk as an indicator for its bacteriological quality has often been criticised.

This paper tries to find better informations concerning the production of pyruvate by various microorganisms, which are relevant for the milk hygiene (3 *Pseudomonas*-strains and 3 strains of *D-Streptococci*). With regard to various initial microbial contents these strains were tested for their pyruvate activity in milk at various incubation temperatures (4, 7 and 12°C) and periods (21 to 40 hours). In these tests the initial microbial content of the cultures could not be correlated with the pyruvate concentrations at the different hours of observation. Moreover the pyruvate concentrations of the cultures at different hours of observation did not correlate well with the colony counts performed at the same time.

This could especially be shown for the *Pseudomonas*-strains, which produced relatively high pyruvate concentrations in spite of low colony counts and vice-versa. Two of three strains of *D-Streptococci* could not increase the pyruvate concentrations of the cultures. 56 % of mixed cultures (*Pseudomonas*-strains mixed with strains of *D-Streptococci*) were also unable to increase the pyruvate concentration in the milk.

Desintegration of microorganisms (strains of *Pseudomonas*, *E. coli* and *D-Streptococci*) inoculated in nutrient broth and heated milk respectively or of original flora of raw milk with a cell disruption bomb by nitrogen high pressure treatment and following decompression, was uneffective in changing the pyruvate concentration of the media, although the colony count could be reduced up to 86 %.

The results of these studies show, that it is very doubtful, to evaluate the bacteriological quality of raw milk by its pyruvate content.

6. Literaturverzeichnis

ABO-ELNAGA, I.G. und O. KANDLER (1965):
Zur Kenntnis der Mikroflora der Melkmaschine.
Milchwiss. 20, 660-662

ABO-ELNAGA, I.G. (1966): Veränderungen des Bakteriengehaltes
während der Lagerung von Rohmilch bei verschiedenen Temperaturen.
Arch. Lebensmittelhyg. 17, 125-128

AROLD, W. (1977):
Modelluntersuchungen zur Pyruvatbildung durch psychrotrophe Mikro-
organismen.
Vet. med. Diss., München

BECK, G. (1967):
Die Qualitätsbewertung von Anlieferungsmilch.
Dtsch. Molk.-Ztg. 45, 1852

DERSELBE (1972):
Psychrotrophe Mikroorganismen in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 278-281

BECKER, G. (1964):
Über die Haltbarkeitsdauer frisch ermolkenener Milch bei verschiedenen
Kühltemperaturen.
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 278-284

BEYER, F. und W. SPRINGMEYER (1978):
Zur Pyruvatbestimmung in konservierten Rohmilchproben.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 31, 1222-1231

BEYER, F., W. SPRINGMEYER und H. MAIR-WALDBURG (1978):
Versuche zur Anwendbarkeit der Pyruvatmessung für die Qualitäts-
kontrolle von Anlieferungsmilch in Bayern.
Dtsch. Molk.-Ztg. 30, 1048-1051

BIERL, J., H.H. GROVE und G. TERPLAN (1978):
Untersuchungen über den Einfluß des Rohmilchkeimgehaltes auf die
Qualität von Hartkäse.
Vortrag anlässlich der Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für
Milchwissenschaft vom 25.-27.9.1978 in Gießen.

BIRKNER, H. (1964):
Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an durch Handmelken
und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen.
Berl. Münchner Tierärztl. Wschr. 77, 85-87

- BRAATZ, R. (1975):
Taxonomie der Pseudomonaden aus Milch.
Milchwiss. 30, 603-604
- BREED, R.S. (1911):
Die mikroskopische Keimzählung.
Zbl. Bakt. II, 30, 337-339
- BRUNS, G. (1976):
Zur Eignung des Pyruvatpools als ein Kriterium zur Förderung und
Erhaltung der Güte eintägig angelieferter roher Vollmilch.
Vet. med. Diss., Hannover
- BUSSE, M. (1965):
Milchkühlung und Bakterienflora.
Dtsch. Molk. Ztg. 45, 1777-1781
- DERSELBE (1970):
Unveröffentlichter Vortrag, Jahrestagung des Verbandes Deutscher
Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten 1970
in Konstanz.
Zit. nach KYNAST, S. (1972)
- DERSELBE (1977a):
Grundlagen der Qualitätskontrolle mit der Pyruvatmethode.
I. Theorie des Parameters Pyruvat.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 31, 328-330
- DERSELBE (1977b):
Grundlagen der Qualitätskontrolle mit der Pyruvatmethode.
II. Eigenschaften des Parameters Pyruvat.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 31, 495-497
- DEMETER, K.J. (1967):
Bakteriologische Untersuchungsmethoden in der Milchwirtschaft.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 4. Aufl.
- DONNELLY, C.B., J.E. GYLCHRIST, J.T. PEELER und J.E.
CAMPBELL (1976):
Spiral plate count method for examination of raw and pasteurized milk.
Applied and Environmental Biology 32, 21-27
- FRASER, D. (1951):
Bursting bacteria by release of gas pressure.
Nature 167, 33-34
- GROVE, H.H. und G. TERPLAN (1977):
Persönl. Mitteilung.

- GRÜN, L. und A. KONSTANTINIDOU (1971):
Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in kühlgelagerter Rohmilch.
Milchwiss. 26, 413-415
- GYLLENBERG, H.G. und E. EKLUND (1966):
A taxonomic survey of psychrophilic bacteria in milk and milk products.
Milchwiss. 21, 261-265
- HACKENSCHMIED, W. (1978):
Pyruvatmessungen im Zusammenhang mit der Gütebezahlung der Milch.
Dtsch. Molk.-Ztg. 19, 620-624
- HAISCH, K.H., A. SCHEBLER und R. SCHORR (1976):
Kosten der Pyruvatbestimmung unter praktischen Bedingungen.
Dtsch. Milchwirtschaft 27, 718-721
- HARTL, G. (1979):
Untersuchungen zum Pyruvatgehalt von Rohmilch unter Berücksichtigung der Produktionshygiene im Erzeugerbetrieb.
Vet. med. Diss., München
- HEESCHEN, W. (1972):
Biochemische Veränderungen von Lebensmitteln durch psychrotrophe Mikroorganismen.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 291-298
- HEESCHEN, W., G. SUHREN und A. ROLLE (1977):
Pyruvatmessung in Milch und Konzept eines Systems zur Erfassung der bakteriologischen Beschaffenheit.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 31, 489-494
- HEESCHEN, W., J. REICHMUTH, A. TOLLE und H. ZEIDLER (1969):
Zur Bestimmung der psychrotrophen Keimflora in der Anlieferungsmilch.
Milchwiss. 24, 721-726
- HEESCHEN, W., A. TOLLE, J. REICHMUTH und H. ZEIDLER (1972):
Die automatisierte Zählung somatischer Zellen der Milch in der kontinuierlichen Durchflußanalyse.
Milchwiss. 27, 745-750
- HEESCHEN, W., H. WERNERY, G. SUHREN und A. TOLLE (1974):
Zur automatisierten Messung von Fett, somatischen Zellen und Pyruvat mit Hilfe der kontinuierlichen Durchflußanalyse.
Milchwiss. 29, 394-402
- IDF (1958):
Internationaler Milchwirtschaftsverband.
Bestimmung des Keimgehaltes von flüssiger und getrockneter Milch.
Standard 3.
Milchwiss. 1961, 16, 650-652

JARVIS, B., V.H. LACH und J.M. WOOD (1977):
Evaluation of the Spiral Plate Maker for the Enumeration of Micro-organisms in Foods.
J. of Applied Bacteriology 43, 149-157

KANDLER, O. (1964):
Überlegungen zur Auswahl der bakteriologischen Prüfmethode und zum Ausbau der Qualitätskontrolle.
Dtsch. Molk. Ztg. 85, 352-358

DERSELBE (1966):
Zur Definition der psychophilen Bakterien.
Milchwiss. 21, 257-261

KÄSTLI, P. (1963):
Milchkunde und Milchhygiene.
Buchverlag Verbandsdruckerei AG, Bern

KIELWEIN, G. (1961):
Einiges zum Problem der Gewinnung keimarmer Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 12, 37-40

DERSELBE (1972):
Klassifizierung der Gattungen Pseudomonas und Aeromonas.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 281-284

DERSELBE (1974):
Zur Bakteriologischen Qualität der Anlieferungsmilch.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 28, 9-11

KLUPSCH, H.J. (1967):
Zur Definition des Begriffes "Qualität der Rohmilch" und praktische Wege zur Qualitätsverbesserung der Rohmilch.
Dtsch. Molk.-Ztg. 88, 1801-1806

KRÜGER, K.E. (1966):
Hygienische Probleme bei der Tiefkühlung der Milch auf dem Bauernhof.
Arch. Lebensmittelhyg. 17, 128-131

KUNDRAT, W. (1966):
Psychrophile Bakterien in Milch und Milchprodukten.
Arch. Lebensmittelhyg. 17, 160-162

KYNAST, S. (1972):
Qualitätskriterien der Anlieferungsmilch.
Milchwiss. 27, 339-340

- LOTT, G. (1972):
Taxonomie und Bedeutung psychrotropher Keime.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 265-268
- MROZEK, H. (1972):
Milchgewinnungsbedingungen und Mikroflora der Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 55-59
- DERSELBE (1975):
Rohmilchqualität als Ergebnis der Behandlung der Melkanlagen.
Dtsch. Molk.-Ztg. 10, 258-261
- NAKAE, T. (1970):
Characterization and classification of psychrotrophic bacteria in milk
by means of temperature-gradient incubation.
Milchwiss. 25, 161-166
- NAKANISHI, T., T. NAKAE und B.S. RASAN (1967):
Psychrotrophic bacteria of raw milk.
Tohoku J. Agric. Res. 18, 247-255
Ref.: Milchwiss. 24 (1969), 507
- NAKANISHI, T. und T. TANABE (1970):
Studies on psychrotrophic bacteria in cows milk.
I. Examination of psychrotrophic bacteria in raw milk.
Jap. J. Dairy Sci. 19, A 44-A50
Ref.: Dairy Sci. Abstr. 33 (1971), 58
- NEITZKE, A. (1974):
Grundlagen und Ergebnisse einer Kalkulation von Untersuchungen auf
somatische Zellen, Pyruvat, Mikrokolonien und antibiotisch wirksame
Hemmstoffe in der Milch.
Dtsch. Molk.-Ztg. 27, 1000-1004
- OLSON, J.R. (1962):
Hygienic aspects of milk and payment for quality.
J. Milk Food Technol. 25, 355-361
- PETTE, J.W. (1961):
Milch und Milchprodukte.
Wiss. Veröffentlichungen, Dtsch. Gesellschaft für Ernährung
H. 8, 70-85, Verlag Steinhopf, Darmstadt
- SEELEMANN, M. (1961):
Qualität und Verantwortung in der Milchwirtschaft.
Dtsch. Molk.-Ztg. 82, 1744-1748

SHARPE, A.N. (1973):

Automation and Instrumentation Developments for Bacteriology Laboratory.
The society for applied bacteriology - Technical series No. 7, 213-218
Academic Press London - New York

STAHLHUT-KLIPP, H. (1975 a):

Zur Methodik der enzymatischen Pyruvat- und Lactatbestimmung
in Rohmilch.

Milchwiss. 30, 468-470

DERSELBE (1975 b):

Zur Methodik der enzymatischen Pyruvat- und Lactatbestimmung aus
Milch in der automatischen Durchflußanalyse.

Dtsch. Molk.-Ztg. 20, 622-626

SUHREN, G. (1973):

Zur Eignung der enzymatischen Pyruvatbestimmung für die Messung
der bakteriologischen Belastung von Milch.

Troph. Diss., Bonn

SUHREN, G., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1976):

Automatische und manuelle enzymatische Pyruvatbestimmung in Milch.
Milchwiss. 31, 257-260

SUHREN, G., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1978):

Pyruvat - ein Parameter zur Erfassung der bakteriologischen Be-
schaffenheit von Milch.

Dtsch. Molk.-Ztg. 16, 520-526

TERPLAN, G. (1966):

Maschineller Milchentzug und Milchqualität.

Dtsch. Molk.-Ztg. 26, 1090-1096

DERSELBE (1969):

Bakteriologische Probleme bei der Milcherzeugung.

Dtsch. Tierärztebl. 17, 589-594

DERSELBE (1971):

Milchproduktion und Milchhygiene.

Prakt. Tierarzt 52, 497-499

DERSELBE (1972):

Hygieneanforderungen und Realität bei der Gewinnung von Milch.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 156, 207-215

THOMAS, S.B. (1966):

Source, Incidence and Significance of Psychrotrophic Bacteria in Milk.

Milchwiss. 21, 270-275

THOMPSON, D.I., C.B. DONNELLY und L.A. BLACK (1960):
A plate loop method for determining viable counts of raw milk.
J. Milk Food Technol. 23, 167-171

TOLLE, A. (1973a):
Zur Pyruvatbestimmung.
Dtsch. Molk-Ztg. 49, 2008-2009

DERSELBE (1973b):
Pyruvat als zentrale Schlüsselsubstanz des bakteriellen Katabolismus in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 24, 149-154

DERSELBE (1974):
Zur Pyruvatbestimmung der Milch.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 28, 12-13

TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN (1966):
Zur Beurteilung der hygienischen Qualität der Anlieferungsmilch mit Hilfe neuer Methoden.
Milchwiss. 21, 757-763

TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN (1968):
Die elektronische Mikrokoloniezählung - ein Verfahren zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Qualität der Rohmilch.
Milchwiss. 23, 65-70

TOLLE, A., W. HEESCHEN, H. WERNERY, J. REICHMUTH und G. SUHREN (1972):
Die Pyruvatbestimmung - ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit von Milch.
Milchwiss. 27, 343-352

UNGLAUB, W., E. LUBENOW und R. GERLACH (1978):
Die Zellgehalts- und Pyruvatbestimmung mittels Auto-Analyzer II, eine praktische Routinemethode zur Beurteilung der Milchqualität?
Tierärztl. Umschau 33, 3-8

WALSER, K. (1966):
Untersuchungen über die Beeinflussung der Eutergesundheit durch die Melkmaschine.
Zbl. Vet. Med. 13, 149

WASSERFALL, F. (1972):
Kritik der geltenden Qualitätsnormen in der Milchwirtschaft - auch aus ernährungsphysiologischer Sicht.
Dtsch. Molk.-Ztg. 8, 296-298

WERNERY, H. (1972):

Zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von Milch durch quantitative Bestimmung von Pyruvat und die Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen.

Vet. med. Diss., Berlin

WIESNER, H.U. (1975):

Zur Aussagekraft des Pyruvatgehaltes in Rohmilch beim Erzeuger.
Milchwiss. 30, 471-473

WHITTLESTONE, W.G. (1962):

The relationship between milking machine practice and bovine mastitis.
Aust. vet. J. 38, 114

WÖBBECKE, F.B. und H.D. LIMMER (1973):

Qualitätsfragen der Anlieferungsmilch aus der Sicht der Verarbeitungsbetriebe.

Molk.-Ztg. Welt der Milch 21, 685-690

ZAADHOF, K.J. und G. TERPLAN (1971):

Zur Eignung einiger Methoden für die Ermittlung der mikrobiologischen Qualität von Rohmilch.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 129-131

ZANDSTRA, T. und T. de VRIES (1977):

The pyruvate content in raw milk as an index of its bacteriological quality.

Netherlands Milk and Dairy J. 31, 109-119

Verordnungen:

Güte-VO des Freistaates Bayern (1977):

Verordnung über die Gütebezahlung von Anlieferungsmilch.

Vom 1. April 1977

GVBl. S. 137

Güte-VO von Hamburg (1975):

Verordnung über die Prüfung und Bezahlung der an Meiereien gelieferten Milch der Freien und Hansestadt Hamburg.

Vom 5. August 1975

GVBl. S. 148

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan sehr herzlich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. H. H. Grove für seine Beratung und Hilfsbereitschaft während der Versuche sowie für die Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre immer gern gewährte Hilfeleistung.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden teilweise mit Sachmitteln eines Forschungsauftrages des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten durchgeführt.

Lebenslauf

Am 29.10.1948 wurde ich als zweites Kind des Kaufmanns Richard Stauß und seiner Ehefrau Melitta Stauß, geb. von Essen, in Schramberg im Schwarzwald geboren.

1951 übersiedelten meine Eltern nach Tübingen, 1954 nach Stuttgart, wo ich eingeschult wurde. Seit 1958 besuchte ich das Gymnasium, zunächst in Stuttgart, und legte nach erneutem Umzug nach Bad Dürrenheim/Schwarzwald 1967 am Fürstenberg-Gymnasium Donaueschingen die Reifeprüfung ab.

Von Oktober 1967 bis September 1970 leistete ich Wehrdienst bei der Bundeswehr.

Im Wintersemester 1970 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich im Sommersemester 1976 mit dem Staatsexamen abschloß. Am 19. Juli 1976 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

Mit der vorliegenden Arbeit begann ich im September 1976. Seit August 1978 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Tierärztliche Fakultät der Universität München, angestellt.

Am 27. Oktober 1978 heiratete ich die Lehrerin Rita Berger.

